

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Física Aplicada
(Área de Ciencia y Tecnología de los Alimentos)



**BACTERIAS PROBIÓTICAS EN LECHE
FERMENTADA. VIABILIDAD, CAPACIDAD
COMPETITIVA Y EFECTO EN LA
EVOLUCIÓN DE PATOLOGÍAS
INTESTINALES**

TESIS DOCTORAL

RAQUEL TABASCO RENTERO

Madrid, 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS



**BACTERIAS PROBIÓTICAS EN LECHE FERMENTADA.
VIABILIDAD, CAPACIDAD COMPETITIVA Y EFECTO
EN LA EVOLUCIÓN DE PATOLOGÍAS INTESTINALES**

Memoria

que para optar al grado de Doctor

presenta la Licenciada Raquel Tabasco Rentero



INSTITUTO DEL FRÍO

Madrid, septiembre de 2009



TERESA REQUENA ROLANÍA, DRA. EN VETERINARIA E INVESTIGADOR CIENTÍFICO DEL C.S.I.C. Y CARMEN PELÁEZ MARTÍNEZ, DRA. EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y PROFESOR DE INVESTIGACIÓN DEL C.S.I.C.

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado: “Bacterias probióticas en leche fermentada. Viabilidad, capacidad competitiva y efecto en la evolución de patologías intestinales” y de la que es autor Raquel Tabasco Rentero, ha sido realizada en el Instituto del Frío del C.S.I.C. bajo su dirección y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid y, por tanto, autorizamos su presentación.

Y para que conste, firman el presente Certificado en Madrid a 9 de septiembre de 2009

Teresa Requena Rolanía

Carmen Peláez Martínez

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento:

A mis directoras de Tesis, las Dras. Teresa Requena y Carmen Peláez, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo durante estos años, por haber confiado en mí para la realización de esta Tesis, por su enorme experiencia y por el gran apoyo mostrado en todo momento.

Al Dr. José Javier Tabera, profesor titular del Departamento de Química Física Aplicada, por su interés demostrado y su gran amabilidad.

Al Ministerio de Ciencia e Innovación, por la concesión de una Beca de Formación de Personal Investigador, y al Instituto del Frío (CSIC), por acogerme y facilitarme el trabajo durante estos cuatro años.

A todo el personal del Instituto del Frío, en especial a Ramón y Felipe, por su gran calidad humana. A todos los departamentos, especialmente al Departamento de Productos Lácteos: a Gloria, Manolí, Pilar, Javier, Marí Carmen, Paquí, Lola, etc., por su gran carisma.

A todos mis compañeros, tanto los que ya no están como los que siguen estando en el "labo", por tantos y tantos momentos que hemos compartido, buenos y malos, tanto en el laboratorio como tomándonos un buen chocolate o unas cañitas. En especial quiero dar las gracias a Tomás (Don Tomás, qué te voy a decir ya, parecía que no llegaría esto nunca, ¿verdad?), a Irene ("miss Bustos", gracias por tu paciencia, y porque me llevo una gran amistad) y a Cristina ("Crís-cros", porque han sido muchos los momentos que hemos compartido y por todas esas confianzas que nos han acompañado).

A todo mi grupo de amigos y amigas del Frío, que siempre han estado ahí al pie del cañón, en especial a Isa, Inés y Chus, las primeritas que conocí y quienes hicieron tan fácil la adaptación al centro desde el primer día que llegué.

A mis últimos "compís" del "Rincón de los Guays" ¡¡cómo no!!! ¡¡Menudo octeto!!

Muchísimas gracias por ese cariño y ese buen humor sobre todo, que ha hecho que esta dura etapa se llevara mejor con vuestra alegría.

A Tatí (imí Bartolí!), por ser tan buena compañera y mejor persona, y porque ese que tú y yo compartimos es el que hace que no perdamos el pavo nunca.

Quiero agradecer también a las Dras. María Saarela y Hanna-Leena Alakomí, por brindarme la oportunidad de realizar una estancia en VTT, en Finlandia, y por el insuperable buen trato que recibí, así como a todas las personas que allí conocí y que tanto enriquecieron mi persona: Marjo, Juhani, Outi, Txell, Molina, etc., etc (¡¡¡¡¡paljon!!).

A mis amigos/as, especialmente a Clara, por tu apoyo constante y por darme ánimos cuando lo necesitaba. Gracias por estar siempre ahí en toda esta larga etapa de tesis.

A Laura, por tu ayuda informática cuando no disponía de medios. A Carmen Marina, por conocerme tan bien, por mimarme desde que estaba en la guardería y por hacer del flamenco más que un sentimiento un nexo de amistad. A Ayman, por sus terapias de relajación y por su ser.

A mi hermano, por ayudarme a ver las dos caras de la moneda. A él y a Isa, por admirarme y valorarme tanto. Os quiero mucho.

A Juan, por haber aparecido en el momento y el lugar oportunos, por haber aparecido en mi vida.

A mis padres, sin los cuales no habría podido hacer realidad esta Tesis. Vosotros sois mi gran apoyo y para vosotros va mi Tesis Doctoral.

En definitiva, a todos los que de alguna manera han formado parte de esta Tesis, directa o indirectamente, gracias.

A mis padres

RESUMEN

RESUMEN

Los alimentos funcionales, entre los que se incluyen los que contienen probióticos, prebióticos o simbióticos, constituyen un amplio sector de productos en el que uno o varios ingredientes presentes de forma natural o añadida, pueden proporcionar supuestos beneficios en la salud de quien los consume. Algunos de estos ingredientes son las bacterias probióticas, entre las que destacan bifidobacterias y lactobacilos. Los efectos beneficiosos de estos microorganismos presentes habitualmente en el intestino se basan en el mantenimiento del equilibrio existente en la microbiota intestinal, donde compiten con bacterias putrefactivas y patógenos oportunistas, frenando así su metabolismo perjudicial e interviniendo positivamente en la homeostasis intestinal. El equilibrio de la microbiota intestinal puede desplazarse negativamente con cierta facilidad a consecuencia del estilo de vida, situaciones de estrés, ciertos hábitos en la dieta, la edad o tratamiento con antibióticos, entre otros factores. Este desequilibrio origina frecuentemente trastornos intestinales de mayor o menor gravedad que en ocasiones pueden asociarse al desarrollo de enfermedades agudas o crónicas. En estas situaciones, la restauración del balance intestinal donde prevalezca la microbiota potencialmente beneficiosa es fundamental en la recuperación de estas alteraciones.

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar los mecanismos por los que bifidobacterias y lactobacilos influyen en el equilibrio de la microbiota intestinal y establecer su posible repercusión en la evolución de la diarrea asociada al tratamiento antibiótico.

Inicialmente se determinó la viabilidad de cepas probióticas de las especies *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* en leche fermentada que contenía el cultivo iniciador del yogur, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, mediante el desarrollo de un procedimiento basado en nuevos medios de cultivo selectivos y diferenciales. Las diferentes condiciones de incubación, así como el empleo de diferentes fuentes de carbono, permitieron la cuantificación de las cinco especies contenidas en la leche fermentada. Para diferenciar las células viables contenidas en esa leche fermentada, sin el previo aislamiento en medios de cultivo y, por lo tanto, con una mayor rapidez de detección y cuantificación, se empleó la técnica de PCR a tiempo real (RTi-PCR) asociada a la

monoazida de propidio (PMA). También se logró la caracterización molecular de las cepas probióticas *L. acidophilus* LA-5, *L. casei* LC-01 y *B. lactis* BB-12, facilitando así su posterior identificación en el tracto intestinal mediante PCR-DGGE y RTi-PCR.

El siguiente objetivo específico consistía en determinar la capacidad de las cepas probióticas para colonizar el intestino, analizando su aptitud para competir en el tracto gastrointestinal. Para ello, se estudió la potencial capacidad de exclusión competitiva que *L. acidophilus* LA-5 podría ejercer contra cepas patógenas intestinales, como *E. coli* O157:H7 y *Salmonella enteritidis*, ya que estudios previos habían demostrado que de las tres cepas probióticas analizadas, *L. acidophilus* LA-5 poseía la mayor capacidad de adhesión a células Caco-2. La inhibición de la colonización de enteropatógenos fue evaluada por mecanismos de exclusión, competición y desplazamiento en las células Caco-2. Los valores más altos de inhibición se obtuvieron con los ensayos de competición, en los cuales la cepa probiótica *L. acidophilus* LA-5 y las bacterias enteropatógenas fueron incubadas simultáneamente con las células Caco-2, obteniéndose un 52% y un 54% de inhibición de la adhesión de *S. enteritidis* y de *E. coli*, respectivamente.

Una de las ventajas selectivas que poseen parte de los microorganismos de la microbiota intestinal para colonizar el intestino es la capacidad de utilizar material no digerible de la dieta. A lo largo de este trabajo, se llevó a cabo un análisis del metabolismo fermentativo de las cepas probióticas en estudio determinando su capacidad para producir ácidos orgánicos, así como también se analizaron las actividades enzimáticas glucosidasas, galactosidasas y β -fructofuranosidasa. Los resultados mostraron que las cepas probióticas *L. acidophilus* LA-5, *L. casei* LC-01 y *B. lactis* BB-12 tenían actividad β -fructofuranosidasa únicamente cuando se habían crecido en presencia de oligofructosa (FOS). Sin embargo, las cepas mostraron actividad β -galactosidasa tanto en cultivos crecidos en leche como en lactosa, aunque la mayor actividad β -galactosidasa se obtuvo en *L. acidophilus* crecido en leche. El análisis de la producción de ácidos orgánicos por las cepas probióticas en estudio sólo detectó la formación de los ácidos láctico, acético y fórmico, aunque el principal ácido orgánico producido por las especies de bacterias lácticas fue el ácido láctico y en el caso de *B. lactis* el ácido acético.

Con el propósito de estudiar la capacidad antimicrobiana de las bacterias lácticas, se llevó a cabo el análisis de la producción de sustancias antimicrobianas en dos trabajos de investigación diferentes. Por una parte, se estudió el papel antimicrobiano de las bacterias lácticas aisladas de productos lácteos de Nigeria contra ciertas bacterias uropatógenas. Tanto *Weisella* spp. como *Lactobacillus brevis* demostraron poseer una marcada actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas uropatógenas, posiblemente debido a la producción de ácidos orgánicos. Sin embargo, de las 96 bacterias lácticas analizadas, tan sólo dos cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* debían su efecto inhibitor a la producción de una sustancia proteica, posiblemente una bacteriocina, cuyo efecto bactericida se observó frente a *Lactobacillus sakei* pero no contra ninguna cepa uropatógena Gram negativa o frente a *Staphylococcus aureus*.

Por otra parte, se llevó a cabo el análisis de la producción de bacteriocinas por las cepas probióticas *L. acidophilus* LA-5, *L. casei* LC-01 y *B. lactis* BB-12. De las cepas ensayadas, sólo *L. acidophilus* LA-5 demostró producir una bacteriocina, la lactacina B, cuando crecía en co-cultivo con *S. thermophilus* o *L. bulgaricus*, ambas especies empleadas en la fabricación del yogur. Se demostró que la expresión de lactacina B por *L. acidophilus* LA-5 también estaba regulada por un mecanismo señal de auto-inducción a través de un péptido inductor secretado por la bacteria que activa un sistema regulador compuesto por una histidin kinasa y un regulador de respuesta.

Finalmente, la evaluación de la eficacia de las cepas probióticas suministradas en leche fermentada para reducir la diarrea asociada a tratamiento antibiótico se llevó a cabo colaborando en un estudio clínico con investigadores del Hospital Fundación de Alcorcón. Con la leche fermentada probiótica, se realizó en el hospital un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo (leche fermentada sin las cepas probióticas). Este estudio se completó en nuestro laboratorio con el análisis de parámetros microbiológicos y bioquímicos en las muestras fecales procedentes de los pacientes. Se llevaron a cabo recuentos de microbiota intestinal cultivable y de las cepas probióticas, así como se determinaron el contenido de ácidos orgánicos y las actividades enzimáticas del contenido fecal. En conclusión, el consumo diario de estas cepas probióticas en leches fermentadas no causó modificaciones significativas en la composición de la microbiota intestinal ni en el metabolismo fermentativo intestinal de los pacientes y, a su vez, tampoco se observaron diferencias significativas en la aparición de diarrea en los pacientes.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. ALIMENTOS FUNCIONALES	1
I.1.1. LECHE FERMENTADA.....	3
II.2. PROBIÓTICOS.....	4
II.2.1. PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS Y SIMBIÓTICOS: DEFINICIONES.	4
I.2.2. MICROORGANISMOS UTILIZADOS COMO PROBIÓTICOS.	5
I.2.3. CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS.	7
I.2.4. CRITERIOS PARA LA EVALUACIÓN DE PROBIÓTICOS.	11
I.2.4.1. Seguridad.....	11
I.2.4.2. Especificaciones funcionales	12
I.2.4.2.1. Resistencia al tránsito por el aparato digestivo.	12
I.2.4.2.2. Adhesión a las células intestinales.	13
I.2.4.2.3. Propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas.....	13
I.2.4.2.4. Producción de sustancias antimicrobianas y propiedades antagónicas contra bacterias patógenas.....	14
I.2.4.2.4.1. Bacteriocinas	14
I.2.4.2.4.2. Ácidos orgánicos	15
I.2.4.2.4.3. Otras sustancias antimicrobianas	15
I.2.4.3. Especificaciones tecnológicas	16
I.2.4.3.1. Propiedades organolépticas deseables.....	16
I.2.4.3.2. Mantenimiento de la viabilidad durante el procesado.	17
I.2.4.3.3. Estabilidad a lo largo del almacenamiento y vida útil del producto.	17
I.3. MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA.....	18
I.3.1. EVOLUCIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA CON LA EDAD	20
I.3.2. MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA.	21
I.3.2.1. Métodos tradicionales.	22
I.3.2.2. Métodos moleculares.....	22
I.3.2.2.1. Técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	23
I.3.2.2.1.1. Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE).....	23
I.3.2.2.1.2. PCR a tiempo real o cuantitativa (RTi-PCR).	24
I.3.2.2.1.3. DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD).....	26
I.3.2.2.1.4. Polimorfismo del tamaño de fragmentos de restricción (RFLP). Análisis de restricción del DNA ribosomal amplificado (ARDRA).	27
I.3.2.2.1.5. Secuenciación.	27
I.3.2.2.2. Técnicas moleculares no basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	28
I.3.2.2.2.1. Hibridación dot-blot	28
I.3.2.2.2.2. Hibridación fluorescente in situ (FISH)	29
I.3.2.2.2.3. Microarrays.....	29

I.3.2.2.2. Metagenómica.	30
I.4. BENEFICIOS SOBRE LA SALUD ASOCIADOS AL CONSUMO DE PROBIÓTICOS	34
I.4.1. MODULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE.....	36
I.4.2. ALTERACIONES INTESTINALES	37
I.4.2.1. Inflamatorias.	37
I.4.2.2. Infecciones.....	39
I.4.2.3. Diarrea asociada a tratamiento antibiótico.	40
II. OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO	47
III. CUANTIFICACIÓN SELECTIVA E IDENTIFICACIÓN DE CULTIVOS MIXTOS DE <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. paracasei</i> <i>y Bifidobacterium lactis</i> EN LECHE FERMENTADA.....	51
IV. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE BACTERIAS LÁCTICAS Y BIFIDOBACTERIAS VIABLES EN LECHE FERMENTADA MEDIANTE EL EMPLEO DE MONOAZIDA DE PROPIDIO Y PCR A TIEMPO REAL.....	61
V. INHIBICIÓN DE UROPATÓGENOS POR BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DE PRODUCTOS LÁCTEOS E INTESTINOS ANIMALES DEL OESTE DE NIGERIA.....	69
VI. <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5 AUMENTA LA PRODUCCIÓN DE LACTACINA B CUANDO “SIENTE” CIERTAS BACTERIAS VIABLES.....	81
VII. METABOLISMO FERMENTATIVO DE BACTERIAS LÁCTICAS Y BIFIDOBACTERIAS. INHIBICIÓN DE LA COLONIZACIÓN DE ENTEROPATÓGENOS POR <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus.....</i>	91
VIII. EFECTO EN LA MICROBIOTA INTESTINAL DE LAS BACTERIAS PROBIÓTICAS CONTENIDAS EN LECHE FERMENTADA EMPLEADAS PARA LA PREVENCIÓN DE LA DIARREA ASOCIADA A ANTIBIÓTICOS.....	117
IX. DISCUSIÓN GENERAL.....	143
IX.1. VIABILIDAD E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS.....	145
IX.2. MECANISMOS DE COMPETENCIA DE LAS BACTERIAS PROBIÓTICAS.....	152
IX.3. EFECTO DE LAS BACTERIAS PROBIÓTICAS EN LA DIARREA ASOCIADA A ANTIBIÓTICOS.....	159
X. CONCLUSIONES.....	163
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	167

I. INTRODUCCIÓN

I.1. ALIMENTOS FUNCIONALES

El concepto de alimento ha pasado de considerarse desde un punto de vista nutritivo y organoléptico a tener una connotación de beneficio para la salud como demanda de una nutrición óptima. El consumidor exige alimentos cada vez más saludables y que le aporten beneficios por encima del valor nutricional que posean. En este sentido, los alimentos funcionales han supuesto un gran desarrollo desde que surgieron en Japón, en 1984. El primer alimento funcional desarrollado en Japón fue una leche fermentada probiótica bajo el nombre de Yakult, cuyo beneficio se atribuía al efecto inmunomodulador de la bacteria *Lactobacillus casei* Shirota (Hosoya, 1998). En la Unión Europea (UE) no existe una legislación específica de los alimentos funcionales aunque sí están reguladas las alegaciones nutricionales y de salud por el Reglamento N° 1924/2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos, que entró en vigor en julio del 2007 (Diario Oficial de la Unión Europea, 2007). A pesar de que el término “alimento funcional” no está claramente delimitado por una definición legal, la UE junto con el ILSI (Internacional Life Sciences Institute) han propuesto definir alimento funcional como aquel alimento que ha sido satisfactoriamente demostrado que afecta beneficiosamente a una o más funciones del cuerpo, aparte de sus características puramente nutricionales. Un alimento funcional puede ser un alimento natural, cuya composición posea algún componente beneficioso, como por ejemplo el licopeno presente en el tomate, o un alimento modificado, al cual se le añade o elimina algún componente para mejorar su funcionalidad, por ejemplo la adición de vitaminas, la eliminación de grasa o la adición de algún microorganismo beneficioso (probiótico). El concepto de alimento funcional supone que sea ingerido como un componente habitual de la dieta y cuyos efectos beneficiosos se deban al consumo de cantidades ingeridas normalmente en una dieta equilibrada.

Entre la diversidad de alimentos funcionales que existen en el mercado, la leche y los derivados lácteos fermentados ocupan un sector mayoritario, ya que además de ser componentes habituales de la dieta, han tenido siempre una gran aceptación social basada en su tradicional reputación como alimentos saludables y en sus excelentes características sensoriales, lo que junto a su riqueza nutricional convierte a estos alimentos en componentes ideales de una alimentación supuestamente funcional.

El incremento de la popularidad de los productos lácteos fermentados en el mercado ha hecho que el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM) lleve a cabo desde 2004 una distinción en las encuestas elaboradas entre el consumo de yogur y de leche bífidos y leche fermentada (MARM, 2009). Durante los últimos años han surgido en el mercado una gran variedad de productos lácteos que basan su publicidad en los efectos beneficiosos para la salud de los probióticos que incorporan y existe una demanda creciente de productos lácteos fermentados que aumenten el valor añadido por su papel funcional. De este modo, el consumo de estos productos ha registrado un incremento permanente durante los últimos años, mientras que el consumo del yogur se mantiene estable o con un ligero descenso (Figura 1). Este fenómeno es llamativo teniendo en cuenta que el precio medio de los productos probióticos es casi el doble del precio del yogur (según los últimos datos referidos a junio de 2009, el precio medio del yogur era de 1,94 € por kg y el de las leches fermentadas y bífidos de 3,47 € por kg).

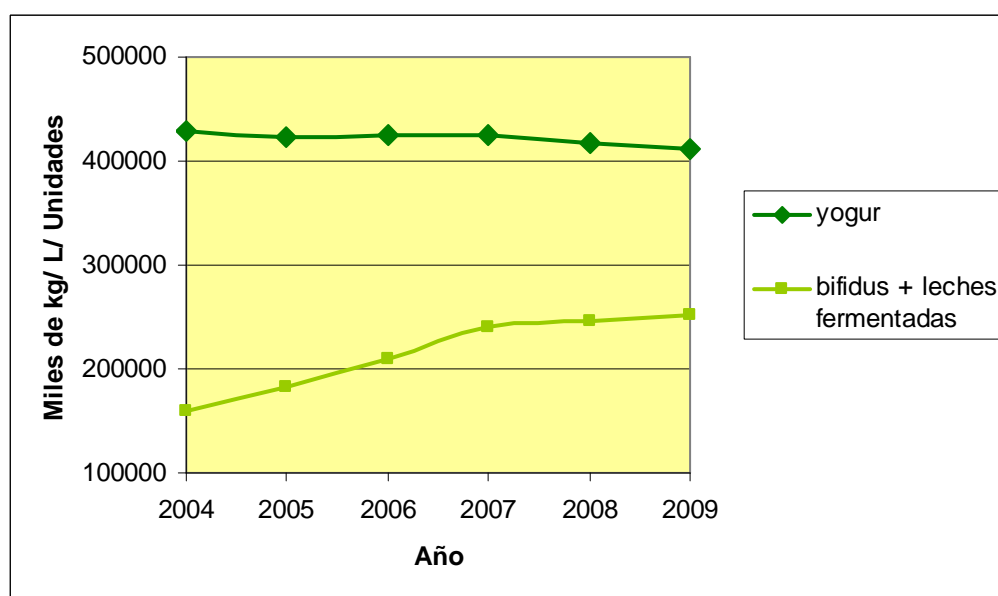


Fig. 1. Evolución del consumo de yogur y leche fermentada en España. Fuente: Encuestas del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.

1.1.1. Leche fermentada

A comienzos del siglo XX, Elie Metchnikoff demostró que el yogur contenía bacterias beneficiosas para el consumidor debido a que éstas transformaban la lactosa de la leche en ácido láctico, imposibilitando así el desarrollo de bacterias potencialmente perjudiciales en el intestino derivadas de la descomposición de los alimentos. Esto explicaba, según él, la longevidad de los campesinos búlgaros, consumidores habituales de yogur. Sin embargo, el origen de la leche fermentada se remonta a las antiguas civilizaciones y al comienzo de la cría de ganado, donde de manera accidental, el contacto de la leche con envases realizados con piel de animal, mantenida a temperatura ambiente, originó la transformación de la leche en un producto fermentado. Las condiciones ambientales de cada región en el mundo, junto con los diferentes microorganismos dominantes en esos productos y el origen de la leche empleada (ya fuera de vaca, cabra, oveja), han hecho que exista una multitud de productos fermentados (Robinson y Tamime, 2006). Existen diferentes tipos de leches fermentadas según el(los) microorganismo(s) que hayan llevado a cabo la fermentación, ya sean bacterias lácticas, mohos o levaduras (Robinson y Tamime, 1990). La selección del microorganismo define las condiciones de la fermentación y por lo tanto, la estructura, sabor y aroma del producto final. Según la Norma Española de Calidad para el yogur o yoghurt (BOE, 2003), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* son los únicos microorganismos aceptados como cultivo iniciador para la obtención de este producto. El término leche fermentada incluye, por tanto, los productos lácteos obtenidos a partir de una tecnología equivalente a la de la fabricación del yogur, pero que emplean además o en sustitución de los del yogur otros microorganismos, los cuales pertenecen habitualmente a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. El estándar CODEX STAN 243-2003 para leches fermentadas, propuesto por la Comisión del Código Alimentario (CODEX Alimentarius Comisión, 2003), establece que estos productos se deben obtener por fermentación de la leche mediante la acción de los cultivos iniciadores adecuados, los cuales deben ser viables, activos y abundantes en el producto hasta su fecha de caducidad. El recuento mínimo de las especies que aparezcan etiquetadas en el producto debe ser de 10^7 unidades formadoras de colonias (ufc)/g para los microorganismos que constituyen el cultivo iniciador y de 10^6 ufc/g para el resto.

II.2. PROBIÓTICOS

II.2.1. Probióticos, prebióticos y simbióticos: definiciones.

El término probiótico fue definido por primera vez en 1965 por Lilly y Stillwell, como “microorganismos que promueven el crecimiento de otros microorganismos”. Más adelante, Fuller (1989) redefinió probiótico como “suplemento alimenticio integrado por microorganismos vivos que afectan beneficiosamente al hospedador que los consume mediante la mejora del equilibrio microbiano intestinal”. Ouwehand y Salminen (1998) incluían también como probióticos a bacterias inactivadas o alguno de sus componentes celulares. Sin embargo, la definición de probióticos más aceptada es la detallada según un informe de consulta a expertos solicitado de forma conjunta por la FAO y la OMS (FAO/WHO, 2002). En ella los probióticos se definen como “microorganismos vivos que ingeridos en cantidades adecuadas ejercen un efecto beneficioso para la salud del consumidor”.

El término prebiótico lo definieron por primera vez Gibson y Roberfroid en 1995 como “aquel ingrediente alimentario no digerible que afecta al consumidor de una manera beneficiosa mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon”. Posteriormente apareció una modificación de esta definición de prebiótico con el fin de ampliar a otras áreas del tracto gastrointestinal (TGI) los beneficios relativos a los cambios microbiológicos y no sólo al colon (Gibson *et al.*, 2004). Para que un ingrediente sea considerado prebiótico debe cumplir tres requisitos:

- Ser resistente a las enzimas gastrointestinales y por lo tanto no ser absorbidos en el TGI.
- Ser fermentado por la microbiota intestinal.
- Estimular de un modo selectivo el crecimiento y/o actividad de bacterias consideradas beneficiosas para la salud y el bienestar.

Los prebióticos más utilizados en la actualidad en la industria alimentaria son carbohidratos no digeribles como los fructanos derivados de la inulina, los transgalacto-oligosacáridos y la lactulosa. Además de estos, otros carbohidratos prebióticos son los isomalto-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos, oligosacáridos de soja y los gluco-

oligosacáridos. Existen otros compuestos potencialmente prebióticos como podrían ser los oligodextranos, el ácido glucónico, el almidón resistente, los polialcoholes, y otros compuestos, que deben ser todavía investigados tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* (Gibson *et al.*, 2004).

Unos de los prebióticos mejor estudiados son los fructo-oligosacáridos (FOS), que son oligosacáridos de unidades de D-fructosa unidos por enlace glicosídico $\beta(2,1)$, con una molécula final de glucosa o fructosa. El grado de polimerización de los FOS varía de 2 a 10 y entre 3 y 60 para la inulina, que es la forma polimérica. Estas sustancias están presentes en frutas (plátanos), verduras (ajos, alcachofas, espárragos, tomates, etc.) y cereales (maíz, cebada, etc.). Muchos de los prebióticos empleados comercialmente son oligosacáridos de cadena corta que son rápidamente fermentados en la región anterior del colon por la microbiota sacarolítica. Sin embargo, para que puedan ejercer su acción en la región distal del colon, se propone el empleo de prebióticos que combinen fructanos de cadena corta con otros de cadenas más largas (Van Loo, 2004).

La combinación de probiótico y prebiótico en un mismo producto se conoce con el nombre de simbiótico. El interés de los simbióticos se basa en el efecto que el componente prebiótico puede ejercer selectivamente sobre el componente probiótico, ya que puede ayudar a mantener la viabilidad de las bacterias probióticas durante el almacenamiento del producto y a su paso por el TGI (Schrezenmeir y De Vrese, 2001; Champagne *et al.*, 2005). Los estudios en simbióticos tienden a la posibilidad de diseñar alimentos que contengan prebióticos cuya acción esté dirigida específicamente a algunos probióticos (Marx *et al.*, 2000).

1.2.2. Microorganismos utilizados como probióticos.

La mayoría de los probióticos que se emplean comercialmente pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Dentro de los lactobacilos se distinguen cepas probióticas en las especies *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. plantarum* y *L. reuteri*, entre otras (Tabla 1). Entre las bifidobacterias se encuentran cepas de las especies *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis* y *B. animalis* subsp. *lactis* (*B. lactis*). Las bacterias lácticas pueden considerarse el grupo bacteriano más numeroso ligado a los humanos. Se asocian de forma natural a las superficies de las

mucosas y al TGI, además de constituir una población autóctona en hábitats relacionados con alimentos, como plantas (frutas, vegetales, cereales), leche o carne, u otros en los que se añaden de forma intencionada para la elaboración de productos fermentados a partir de los sustratos anteriores. Por otra parte, las bifidobacterias habitan fundamentalmente en el colon y son los organismos que primero colonizan el TGI después del nacimiento. De esta manera, el TGI se considera el lugar donde los probióticos llevan a cabo la mayoría de la actividad moduladora de la salud. Otras especies empleadas como probióticos pertenecen al género *Enterococcus*, como *E. faecalis* y *E. faecium*, al género *Pediococcus* (*P. acidilactici*) y al género *Streptococcus* (*S. thermophilus*). Aparte de las bacterias lácticas y las bifidobacterias, también se emplean como probióticos algunas propionibacterias como *Propionibacterium freudenreichii* y levaduras del género *Saccharomyces* (*S. boulardii*).

Tabla 1: Microorganismos probióticos (adaptado de Champagne *et al.*, 2005 y Prado *et al.*, 2008).

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Otras especies
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentes</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. essensis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sacharomyces boulardii</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. johnsonii</i>		
<i>L. lactis</i>		
<i>L. paracasei</i>		
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		

Tabla 2: Bacterias lácticas probióticas existentes en el mercado a nivel mundial
(adaptado de Prado *et al.*, 2008).

Cepas probióticas	Origen
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Yakult, Japón
<i>Lactobacillus crispatus</i> CTV05	Gynelogix, EEUU
<i>Lactobacillus reuteri</i> MM53	BioGaia, Suecia
<i>Lactobacillus casei</i> F19	Arla Foods, Dinamarca/ Suecia
<i>Bifidobacterium lactis</i> HN019	Danisco, Francia
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Valio, Finlandia
<i>Propionibaacterium freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> JS	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	Rhodia, EEUU
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFB 1748	
<i>Lactobacillus johnsonii</i> LA1 (NCC 533)	Nestlé, Suiza
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA10 (NCC 90)	
<i>Lactobacillus fermentum</i> RC-14	Urex, Canadá
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1	
<i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001	Danone, Francia
<i>Bifidobacterium animalis</i> DN-173 010	
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v	Probi AB, Suecia
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 271	
<i>Lactobacillus casei</i> CRL 431	Chr. Hansen, EEUU
<i>Bifidobacterium lactis</i> BB-12	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> LBY27	
<i>Streptococcus thermophilus</i> STY-31	

1.2.3. Características metabólicas de las cepas probióticas.

El potencial beneficio de los alimentos probióticos se basa en la influencia que ejerce la microbiota intestinal en el estado de salud del individuo y en como ésta puede verse influenciada por diferentes hábitos de alimentación. En este sentido, se considera que el TGI es el lugar donde los probióticos llevan a cabo la mayoría de la actividad moduladora de la salud. Los mecanismos por los que los probióticos benefician la salud humana se dividen típicamente en una serie de categorías generales, incluyendo el reforzamiento de la barrera intestinal, la modulación de la respuesta inmune y el

antagonismo con patógenos, bien por la producción de compuestos antimicrobianos o a través de la competición por sitios de unión en la mucosa. A pesar de la existencia de numerosos trabajos de investigación que evidencian la respuesta del organismo a la presencia de probióticos en el TGI, hay pocos estudios que establecen la conexión a nivel molecular entre esta respuesta y las bacterias que la inducen. Una información muy relevante al respecto y que está abriendo el campo en el conocimiento a nivel molecular de la interacción bacteria-huésped, es la generada recientemente tras la secuenciación y organización de los genomas de bacterias lácticas, tanto de cepas probióticas como de cultivos iniciadores empleados para la fabricación de yogur y leche fermentada. A partir de estos estudios, se han identificado las bases moleculares asociadas a la adaptación de estos microorganismos al crecimiento en leche o a la persistencia en el intestino humano y al entendimiento de éste como su hábitat natural.

El análisis del genoma de *L. bulgaricus* ATCC 11842 (van de Guchte *et al.*, 2006) ha descubierto indicios relativos a una rápida adaptación ambiental de esta especie desde un hábitat vegetal hacia un ambiente lácteo rico en proteínas y lactosa, mediante la pérdida de funciones superfluas y adquisición de otras. Entre ellas, cabe destacar la expresión de una proteinasa de pared celular responsable de hidrolizar la caseína en péptidos y aminoácidos. La acumulación de estos compuestos estimula el crecimiento de *S. thermophilus* durante la elaboración del yogur. Esta última bacteria proporciona a su vez ácido fórmico y CO₂ para el crecimiento de *L. bulgaricus*. Este fenómeno de estimulación mutua de crecimiento se conoce como protocooperación. En el genoma de *L. bulgaricus* se identifica también la capacidad potencial para la biosíntesis de folato para la que requiere la incorporación externa de ácido *p*-aminobenzoico (PABA), que a su vez sería suministrado por *S. thermophilus*.

El estudio comparativo de los genomas secuenciados procedentes de tres cepas de *S. thermophilus*, revela que esta especie continúa evolucionando como bacteria especializada en el crecimiento en leche (Hols *et al.*, 2005). La especie ha mantenido un metabolismo nitrogenado bien desarrollado mientras que el catabolismo de carbohidratos se ha reducido a la utilización fundamentalmente de lactosa, como azúcar predominante de la leche. A diferencia de los estreptococos patógenos, *S. thermophilus* ha perdido prácticamente la mayoría de funciones asociadas a la virulencia y se caracteriza por la incapacidad para utilizar una extensa variedad de carbohidratos, la sensibilidad a un elevado número de antibióticos y la ausencia de componentes extracelulares que facilitan la adhesión a mucosas o permiten eludir las defensas del

hospedador. Por otro lado, *S. thermophilus* ha adquirido mediante transferencia genética horizontal determinados caracteres importantes en su fenotipo industrial, como es la disponibilidad de un co-transportador específico para la lactosa, la biosíntesis de polisacáridos, la producción de bacteriocinas, sistemas de protección a la infección por fagos o la tolerancia al oxígeno. En conjunto, la restricción de su nicho ecológico a la leche y la consiguiente evolución adaptativa permite explicar el crecimiento acelerado de *S. thermophilus* en leche.

Por su parte, el análisis comparativo de genomas de cepas probióticas (Klaenhammer *et al.*, 2005), refleja la presencia general en estos microorganismos de una serie de características relevantes para su papel como moduladores de la salud y para su capacidad de sobrevivir y competir en el TGI. Entre ellas se encuentran: factores de adherencia como fimbrias (*B. longum*, *L. johnsonii*), proteínas de unión a mucus (*L. johnsonii* y *L. acidophilus*) o a fibronectina (*L. acidophilus*) y producción de exopolisacáridos (*L. plantarum*, *L. johnsonii* y *L. acidophilus*); producción de bacteriocinas; factores de tolerancia a ácido y estrés (*L. plantarum*, *L. johnsonii* y *L. acidophilus*); e hidrolasas de sales biliares (*L. johnsonii* y *L. acidophilus*). Dentro de la información procedente del estudio del genoma de algunas cepas probióticas concretas, se puede destacar la información procedente de *L. johnsonii* NCC 533 (también denominado *L. acidophilus* La1). Este microorganismo es un aislamiento humano caracterizado por su capacidad para persistir y competir en el TGI. El análisis de su genoma (Pridmore *et al.*, 2004) revela la presencia de genes que pueden ser responsables de dicha capacidad de colonización y de competitividad intestinal. Esta cepa es incapaz de sintetizar aminoácidos o nucleótidos derivados de purina y cofactores, pero en compensación presenta más de 20 transportadores de aminoácidos, más de 25 peptidasas citoplásmicas y 16 transportadores para azúcares (fundamentalmente mono-, di- y trisacáridos, pero no polisacáridos). Estos resultados sugieren, en conjunto, una adaptación de convivencia estrecha con el organismo hospedador o con otros microorganismos intestinales que le proporcionen nutrientes simples monoméricos. Por otro lado, en su adaptación al nicho intestinal se caracteriza por la abundancia de proteínas de pared celular de gran tamaño y poco comunes, incluidas fimbrias glicosiladas, posiblemente asociadas a la adhesión a glicoproteínas u otros componentes de la mucina; característica considerada de interés para su persistencia en el TGI. También se considera relevante la presencia de tres hidrolasas de sales biliares y de dos transportadores únicos de ácidos biliares.

L. acidophilus NCFM es también una cepa probiótica con elevada capacidad para sobrevivir en el TGI. Esta cepa se caracteriza por una elevada expresión de genes relacionados con el transporte y el metabolismo de carbohidratos (Barrangou *et al.*, 2006), incluidos fructooligosacáridos y rafinosa, indicando su adaptación para competir ventajosamente en las condiciones limitantes en carbohidratos del tracto intestinal humano. El análisis del genoma de este microorganismo revela la presencia de genes que codifican proteínas de unión a mucina y fibronectina, relacionadas con la adhesión a células intestinales, y de sistemas de regulación que condicionan su tolerancia a la acidez. Aspectos, en conjunto, que probablemente contribuyen a la supervivencia gástrica de este microorganismo y a promover interacciones con la mucosa y la microbiota intestinales.

En relación a los genomas disponibles de bifidobacterias, destaca la información obtenida de *B. longum* NCC2705 (Schell *et al.*, 2002). El análisis de este microorganismo indica la presencia de una gran cantidad de proteínas especializadas en el catabolismo de muchos oligosacáridos, incluidas novedosas glicosil hidrolasas activas en polímeros de plantas no digestibles como xilano y hemicelulosa o glicoproteínas y glicoconjugados derivados del mucus intestinal. De hecho, más del 8.5% de las proteínas codificadas en el genoma de *B. longum* están asociadas al metabolismo y transporte de carbohidratos, con más de 40 glicosil hidrolasas con acción sobre di, tri y polisacáridos y 8 transportadores con elevada afinidad por oligosacáridos. Esta capacidad de recuperar nutrientes a partir de la fibra vegetal presente en el contenido intestinal, probablemente contribuye a la competitividad y persistencia de las bifidobacterias en el colon, caracterizado por un pobre contenido en mono y disacáridos. En cuanto a la capacidad de adhesión y colonización epitelial, este microorganismo también se distingue por la expresión de proteínas de tipo fimbrias y de unión a glicoproteínas. El análisis del genoma de *B. lactis* (Kim *et al.*, 2009) también ha revelado la presencia en este microorganismo de funciones probióticas como son la utilización de factores bifidogénicos y la presencia de una gran variedad de enzimas glicosídicas y de biosíntesis de polisacáridos.

1.2.4. Criterios para la evaluación de probióticos.

Entre los requisitos exigibles a los microorganismos probióticos, no existe uniformidad ya que se han descrito numerosos criterios de selección. No obstante, existe un acuerdo prácticamente general sobre determinados aspectos, que son: (1) residente del hábitat humano; (2) ausencia de patogenicidad; (3) resistencia al tránsito por el aparato digestivo; (4) capacidad para resistir los procesos tecnológicos; (5) viabilidad durante toda la vida útil del producto; y (6) evidencia científica de efecto(s) beneficioso(s) en estudios clínicos correctamente diseñados. De manera general, podemos agrupar los criterios de selección de probióticos desde tres puntos de vista: seguridad, funcional y tecnológico.

1.2.4.1. Seguridad

Uno de los criterios de seguridad exigibles a los microorganismos probióticos es que sean de **origen humano** y que hayan sido aislados del TGI de personas sanas. Se estima que las cepas de origen humano resistirían mejor el paso a través del TGI y estarían más adaptadas al ambiente intestinal humano para su posible implantación o colonización del epitelio gastrointestinal (Ouwehand *et al.*, 1999; Shortt, 1999). Sin embargo, hay estudios que demuestran que la capacidad de cepas probióticas para adherirse al epitelio del hospedador es independiente de su origen (Rinkinen *et al.*, 2003). De hecho, en algunas situaciones es difícil conocer el origen último de la cepa con exactitud, ya que cualquiera que esté presente en el intestino humano podría tener su origen en un alimento consumido de procedencia animal o vegetal (Dunne *et al.*, 2001).

Otro criterio exigible es la **ausencia de patogenicidad**. La OMS, en colaboración con la FAO, recomienda como criterio de seguridad de los probióticos la ausencia de factores de virulencia mediante ensayos con modelos animales. Algunas especies de *Enterococcus* han demostrado la presencia de diferentes factores de virulencia tales como sustancias de agregación y citolisinas (Vankerckhoven *et al.*, 2008). Además de los factores de virulencia, hay que conocer la capacidad de los microorganismos para intercambiar material genético asociado a patogenicidad. Un microorganismo probiótico **no debe contener determinantes genéticos transmisibles que confieran resistencia a antibióticos**. La transferencia de resistencia a antibióticos

entre microorganismos puede reducir las posibilidades terapéuticas de un antibiótico en una enfermedad infecciosa. Por eso, es de gran importancia evaluar la resistencia a antibióticos en cada bacteria de interés probiótico y, en su caso, estudiar la capacidad de transferir los genes de resistencia (Klare *et al.*, 2007). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, *European Food Safety Authority*) emitió un informe en el 2005 en el que explicaba que había dos tipos de resistencia a antibióticos: (a) una resistencia natural o de carácter intrínseca, que presenta un bajo riesgo de diseminación horizontal, y por lo tanto esas cepas deberían ser aceptables para consumo humano y (b) una resistencia adquirida, debida a la transmisión de los genes de resistencia cuando éstos están localizados en elementos genéticos móviles, como plásmidos o transposones, la cual presenta un riesgo de salud pública ya que puede transferirse a la microbiota humana o animal o a bacterias patógenas oportunistas.

I.2.4.2. Especificaciones funcionales

Para que los microorganismos probióticos ejerzan un efecto beneficioso en la salud del hospedador deben ser capaces de alcanzar, sobrevivir e implantarse o mantenerse viables durante un cierto tiempo en el intestino. Los criterios funcionales se basan en las propiedades biológicas y características probióticas de las cepas, además de aspectos de resistencia al tránsito gastrointestinal.

I.2.4.2.1. Resistencia al tránsito por el aparato digestivo.

Para que un probiótico ejerza el efecto beneficioso esperado debería llegar viable al lugar diana donde realizar dicho efecto. Esto supone atravesar el TGI exponiéndose a la acidez del estómago, al efecto tóxico de las sales biliares y a las enzimas gástricas y pancreáticas, lo que representa un obstáculo para las bacterias. Esta propiedad de resistencia al TGI puede evaluarse mediante ensayos *in vitro* o mediante modelos más complejos que simulan el proceso dinámico de la digestión.

1.2.4.2.2. Adhesión a las células intestinales.

La adhesión de las cepas probióticas a las células intestinales y su posterior colonización supone la persistencia de estos microorganismos en el tracto intestinal y, por ejemplo la posibilidad de desencadenar interacciones con las paredes de las mucosas intestinales, facilitando así el contacto con el tejido linfoide y mediando efectos en el sistema inmune (Saarela *et al.*, 2000). Los estudios de adhesión se realizan habitualmente en ensayos *in vitro*, que emplean líneas celulares intestinales humanas como Caco-2, HT-29 y HT-29-MTX. Estos modelos simulan la barrera del epitelio intestinal, la cual tienen que atravesar los microorganismos patógenos para infectar el sistema circulatorio del hospedador y extenderse por todo el organismo (Servin, 2004). Se ha observado una gran variabilidad de adhesión entre cepas, ya que esta característica depende de diversos factores, como la concentración inicial de bacterias, el medio donde han sido cultivadas, el pH del medio o las interacciones entre microorganismos (Ouwehand, 2000).

1.2.4.2.3. Propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas.

Una de las capacidades que poseen los probióticos es la posible disminución de las actividades enzimáticas mutagénicas o carcinogénicas en el lumen intestinal. Existen algunas actividades enzimáticas, como nitroreductasa, azoreductasa y β -glucuronidasa, que están relacionadas con la conversión de procarcinógenos a carcinógenos en el colon. Se ha demostrado que algunas bacterias probióticas disminuyen estas actividades enzimáticas en muestras fecales, como *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* GG y *L. casei*. Sin embargo, aunque es evidente que algunos probióticos muestran actividades antimutagénicas y anticarcinogénicas *in vitro*, existen resultados contradictorios y se requieren modelos *in vivo* para poder afirmar la capacidad preventiva cancerígena de los probióticos.

1.2.4.2.4. Producción de sustancias antimicrobianas y propiedades antagónicas contra bacterias patógenas.

El fenómeno de antagonismo se basa generalmente en la producción de sustancias que inhiben o inactivan con mayor o menor especificidad a otras bacterias relacionadas o no taxonómicamente. Los diversos mecanismos por los que las bacterias probióticas ejercen una acción inhibitoria sobre las bacterias patógenas incluyen: descenso de pH debido a la producción de ácidos orgánicos y otras moléculas, la competencia por nutrientes, la competencia por los sitios de adhesión, la estimulación del sistema inmune y la producción de sustancias antimicrobianas (Makras y De Vuyst, 2006). Dentro de las sustancias antimicrobianas, éstas pueden ser, además de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y reuterina.

1.2.4.2.4.1. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son sustancias antimicrobianas de naturaleza proteica que presentan un efecto bactericida frente a bacterias relacionadas filogenéticamente, aunque existen algunas bacteriocinas con un amplio espectro de inhibición, como la pediocina y la nisina, las cuales tienen un gran interés como bioprotectores en alimentos (Loessner *et al.*, 2003; Kleerebezem, 2004). Debido a su naturaleza proteica, las bacteriocinas se inactivan por una o más enzimas proteolíticas, incluyendo aquellas de origen pancreático (tripsina y α -quimotripsina) y algunas de origen gástrico, como la pepsina. Esta característica aumenta el interés de la utilización de las bacteriocinas en productos alimentarios, ya que serían inactivadas durante su paso por el TGI, sin causar riesgos relacionados con el uso de antibióticos.

El interés científico hacia el conocimiento de la estructura y funcionamiento de las bacteriocinas ha permitido que exista en la actualidad una base de datos que contiene gran número de secuencias genéticas de bacterias productoras de bacteriocinas, en las que se pueden estudiar los genes implicados en la producción y regulación de las bacteriocinas (BACTIBASE; Hammami *et al.*, 2007). Recientemente, se han desarrollado herramientas para la predicción de genes estructurales de bacteriocinas a partir de las secuencias de genomas bacterianos (BAGEL, De Jong *et al.*, 2006). Aparte de la diversidad de bacteriocinas que existen, la mayoría requieren un conjunto de elementos genéticos necesarios para su producción, entre los que se incluyen genes

estructurales de la bacteriocina, de inmunidad y de transporte (Dobson *et al.*, 2007). Muchas bacteriocinas producidas por bacterias lácticas están reguladas por un péptido inductor, cuya señal activa un sistema regulador de tres componentes (Eijsink *et al.*, 2002; Turovsky *et al.*, 2007). La activación del péptido inductor también puede producirse por el contacto de la célula de la bacteria productora de la bacteriocina con otras células (bacterias inductoras). Existe, por lo tanto, una capacidad de inducción interna (por el péptido de inducción) y externa (por el contacto con células diana inductoras) que en conjunto participan en el fenómeno de *quorum sensing* (Dobson *et al.*, 2007).

1.2.4.2.4.2. Ácidos orgánicos

A diferencia de las bacteriocinas, que ejercen su acción sobre especies filogenéticamente similares, muchas bacterias lácticas producen ácidos orgánicos, particularmente ácidos acético y láctico, capaces de inhibir microorganismos patógenos como *Salmonella* spp., *E. coli*, *Clostridium* spp. y *Helicobacter* spp. (Makras y De Vuyst, 2006). El mecanismo de inhibición de los ácidos orgánicos se basa, en parte, en la disociación molecular de los ácidos orgánicos en el medio, dando lugar a la aparición de protones y aniones. Se produce un gradiente de protones y las células tienden a transportarlos a su interior, pudiendo causar desestabilización de la permeabilidad de la membrana. Además, los ácidos acético y láctico en forma no disociada, debido a su naturaleza lipofílica, pueden atravesar la membrana celular y disociarse en el citoplasma (Requena y Peláez, 1995).

El ácido láctico puede servir de sustrato para otras especies de la microbiota intestinal y ser degradado a ácidos grasos de cadena corta (SCFA), como butirato y propionato. Concretamente, el butirato es la fuente energética de los colonocitos y está implicado en la regulación de la apoptosis y diferenciación celular. El butirato es, además, uno de los SCFA con mayor potencial anticarcinogénico (Commane *et al.*, 2005).

1.2.4.2.4.3. Otras sustancias antimicrobianas

Muchas bacterias lácticas en presencia de oxígeno producen **peróxido de hidrógeno** (H₂O₂), el cual tiene un alto poder oxidante. Este compuesto es muy reactivo

y causa daños en la membrana lipídica y en el DNA, alterando la viabilidad de las células.

Las bacterias lácticas fermentadoras del citrato producen una sustancia llamada **diacetilo** (2,3-butanodiona) que posee efectos antimicrobianos a elevadas concentraciones. El mecanismo de inhibición se debe a la desactivación de enzimas microbianas por la reacción del diacetilo con la estructura guanido del aminoácido arginina. Aunque el diacetilo se considera una sustancia GRAS (generalmente reconocido como seguro) no se emplea mucho ya que se requieren elevadas concentraciones para que ejerza un efecto inhibitorio y posee un aroma intenso.

La **reuterina** (β -hidroxipropionaldehído) es una sustancia antimicrobiana producida por *L. reuteri*. La reuterina es un metabolito neutro asociado con el metabolismo anaeróbico del glicerol. Esta molécula presenta un amplio espectro de inhibición frente a *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, y *Candida*. La reuterina actúa inhibiendo la enzima ribonucleótido reductasa, que cataliza el primer paso en la síntesis del DNA, lo que explica su amplio espectro de inhibición. Además se ha visto que la reuterina tiene un efecto inhibidor en un amplio margen de pH y es resistente a enzimas proteolíticas y lipolíticas, haciendo interesante su uso como bioconservante de alimentos (Rodríguez *et al.*, 2003).

I.2.4.3. Especificaciones tecnológicas

La tecnología para el uso de productos lácteos como portadores de probióticos debe optimizarse asegurando la supervivencia tanto de los microorganismos que participan en la fermentación como de los probióticos que se añaden. El proceso tecnológico puede influir en las propiedades funcionales de los probióticos, por lo que es importante mantener la viabilidad de los mismos durante y después del procesado.

I.2.4.3.1. Propiedades organolépticas deseables.

Los probióticos no deben afectar adversamente a las características de aroma y sabor del producto, ni incrementar la acidificación durante su periodo de vida útil. Por ello, la mayoría de productos incluyen además de las cepas probióticas, un cultivo iniciador en la elaboración del producto. Los microorganismos interaccionan con su

entorno mediante el intercambio de componentes del medio por productos de su metabolismo, por lo que la composición química de los productos determina en gran medida su actividad metabólica. Son variables esenciales la fuente de carbono disponible (tipo y cantidad), el grado de hidrólisis de las proteínas como fuente de aminoácidos esenciales y la composición y grado de hidrólisis de los lípidos lácteos que determinan la disponibilidad de ácidos grasos de cadena corta (Saarela *et al.*, 2000).

1.2.4.3.2. Mantenimiento de la viabilidad durante el procesado.

La producción de probióticos y cultivos iniciadores es un paso importante para mantener un gran número de células viables en el producto. El uso de concentrados líquidos y congelados hace unos años ha pasado al empleo de preparaciones desecadas por sublimación (liofilización) o pulverización. A pesar de que los preparados desecados por pulverización son más económicos que los desecados después de la congelación, existen muchas bacterias que no resisten las altas temperaturas empleadas en el método de pulverización. Como consecuencia, la liofilización es uno de los métodos más populares para la producción de preparados probióticos y de cultivos iniciadores (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002).

1.2.4.3.3. Estabilidad a lo largo del almacenamiento y vida útil del producto.

Para poder mantenerse en concentraciones elevadas en el producto y viables, las bacterias probióticas deben responder a requerimientos básicos para su desarrollo comercial. Estos son que sobrevivan suficientemente en los productos y que mantengan una estabilidad fisiológica, genética y funcional durante el almacenamiento. La presencia de bacterias vivas en los productos probióticos hace necesaria su refrigeración durante el almacenamiento. Con ello se aseguran niveles altos de supervivencia y suficiente estabilidad del producto. Un aspecto importante de la interacción entre los probióticos y la matriz del alimento y el cultivo iniciador es el tiempo de interacción, es decir, si los probióticos están presentes durante la fermentación o si se añaden una vez finalizada. En este último caso, las interacciones son mínimas ya que la adición puede realizarse inmediatamente antes del enfriamiento a temperaturas por debajo de 8 °C o incluso después, estableciéndose condiciones que reducen considerablemente el

metabolismo tanto de probióticos como de las bacterias de la fermentación (Saarela *et al.*, 2000, Champagne *et al.*, 2005).

I.3. MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA

La microbiota intestinal ejerce un papel importante en la salud del hospedador (Servin, 2004), y sus funciones se pueden clasificar en tres tipos (Collins y Gibson, 1999; Guarner y Malagelada, 2003):

- ✓ Metabólicas, interviniendo en la asimilación de nutrientes de la dieta.
- ✓ Protectoras, contribuyendo al efecto barrera y al desplazamiento de microorganismos patógenos y oportunistas.
- ✓ Inmunomoduladoras, interviniendo en la modulación del sistema inmune y en el desarrollo y la proliferación celular.

El tracto gastrointestinal humano es un complejo ecosistema donde el intestino humano alberga más de 500 especies diferentes de bacterias (Pham *et al.*, 2008) que pueden llegar hasta 10^{14} ufc de bacterias en todo el TGI (Vaughan *et al.*, 2000; Zboril, 2002). Aparte de la diversidad bacteriana y la variabilidad individual de cada persona, la microbiota difiere cuantitativa y cualitativamente a lo largo del TGI. El estómago, debido a la secreción de ácido gástrico se caracteriza por la presencia de microorganismos resistentes a pH ácidos y por la ausencia de microorganismos anaerobios, encontrándose así especies de los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus*. Los niveles de bacterias en la zona que comprende estómago, duodeno y yeyuno están en torno a 10^5 ufc/g de contenido. Los principales factores limitantes para los microorganismos en el intestino delgado son los movimientos peristálticos y la secreción de jugos pancreáticos y biliares, con lo cual siguen siendo los lactobacilos y estreptococos los géneros mayoritarios. A medida que se avanza en el lumen intestinal, la proporción de especies anaerobias aumenta. La mayor concentración de microorganismos se encuentra en el colon, alcanzando niveles de 10^{10} a 10^{11} ufc/g, donde el 99% de la microbiota es anaerobia. En la Figura 2 se pueden observar los grupos microbianos mayoritarios detectados en heces humanas. A pesar de la gran diversidad, la población microbiana más comúnmente cultivada de muestras fecales son: *Bacteroides*, *Clostridium*,

Eubacterium, *Ruminococcus*, *Fusobacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Peptoscoccus*, *Enterobacter* y *Veillonella*, aunque el 50% de la población bacteriana obtenida pertenece a *Bacteroides*, *Clostridium* y *Eubacterium* (Saarela *et al.*, 2002). No obstante, la microbiota cultivable supone el 10-50% de la totalidad de la microbiota intestinal, ya que existe un gran número de especies microbianas con requerimientos de crecimiento desconocidos, o bien con condiciones estrictas de anaerobiosis y en definitiva, con dificultades de ser cultivadas. El estudio de la microbiota intestinal comprende la presencia de microorganismos (cualitativa y cuantitativa), su actividad (*in vitro* o *in vivo*) y las interacciones entre microorganismos (sinergismo y competencia) (Zoetendal *et al.*, 2004).

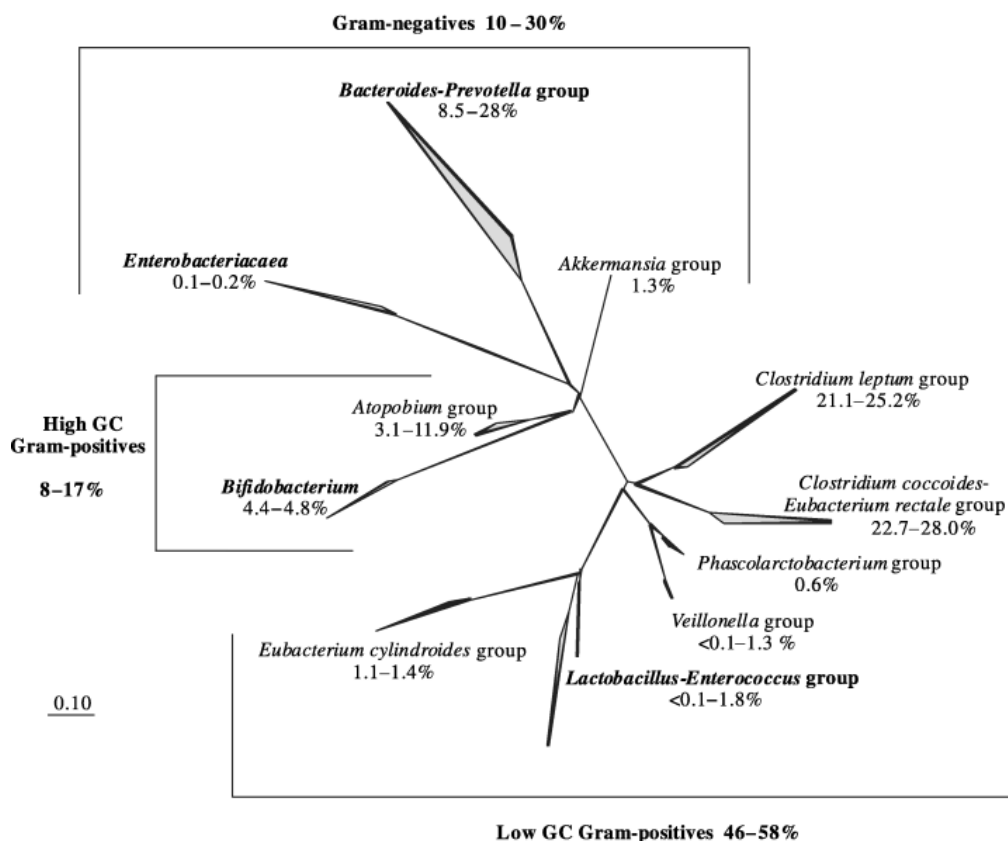


Fig.2. Árbol filogenético según la secuencia del gen 16S rRNA de los diferentes grupos bacterianos mayoritarios detectados en heces humanas, así como su porcentaje en dichas muestras (Zoetendal *et al.*, 2006).

El avance de las técnicas moleculares durante la última década ha permitido incrementar el conocimiento sobre la microbiota intestinal. La tendencia actual en el estudio de la microbiota se dirige hacia la secuenciación “masiva” de material

genético procedente de librerías de clones con miles de secuencias del microbioma intestinal. En un trabajo sobre microbioma intestinal, Li *et al.* (2008) llegaron a secuenciar 7255 secuencias del gen 16S rRNA de 7 individuos, que produjeron 476 unidades taxonómicas operativas (OTUs). Las estructuras predominantes que se han encontrado en el microbioma intestinal son *Bacteroides* y *Firmicutes*, aunque cada individuo parece tener un alto grado de variación en la relación *Bacteroides/Firmicutes* de entre 0,26 a 1,36 (Li *et al.*, 2008). Dentro del género *Bacteroides*, se ha secuenciado el genoma de *B. thetaiotaomicron*, que representa un 12% del total de bacteroides y un 6% de toda la microbiota presente en el TGI, analizada según el gen 16S rRNA. *B. vulgatus* y *B. distasonis* representan el 31% y el 0,8% de los bacteroides totales en el TGI, y junto con *B. thetaiotaomicron*, las tres especies tienen un gran número de genes implicados en el metabolismo de carbohidratos (Xu *et al.*, 2007; Carroll *et al.*, 2009).

Estudios recientes de metagenómica han permitido verificar que existe una gran interacción entre la microbiota intestinal y la dieta. Se ha demostrado que la microbiota de personas obesas es diferente a la de las personas con peso normal, y que la relación *Bacteroides/Firmicutes* es menor en personas obesas (Kurokawa *et al.*, 2007). Del mismo modo, se ha demostrado que la disminución de carbohidratos en la dieta influye en la microbiota reduciendo los niveles de *Roseburia* spp., *Eubacterium rectale* y *Bifidobacterium* spp., aunque en este caso el género *Bacteroides* no parece verse afectado (Duncan *et al.*, 2007). En un estudio reciente sobre obesidad en adolescentes, se ha observado que una pérdida de peso superior a 4 kg se correlacionaba significativamente con la reducción de *Clostridium histolyticum*, *Clostridium lituseburense* y el grupo *E. rectale-Clostridium coccoides* y con el incremento del grupo *Bacteroides/Prevotella* (Nadal *et al.*, 2009).

1.3.1. Evolución de la microbiota intestinal humana con la edad

Diversos estudios indican que el desarrollo de la microbiota específica de cada individuo comienza justo después del nacimiento (Wang *et al.*, 2004). Estudios recientes han revelado que la leche materna es una fuente de bacterias comensales para el intestino del lactante, siendo particularmente rica en bacterias lácticas (Martín *et al.*, 2003).

Estudios metagenómicos han demostrado que la microbiota de los bebés es más simple pero más variable que la de niños y adultos, quienes poseen una microbiota más compleja pero uniforme (Kurokawa *et al.*, 2007). El género microbiano que más difiere según la edad es *Bifidobacterium*, el cual supone un 80-90% de la microbiota fecal total en niños y un 3% de la microbiota total en adultos (Harmsen *et al.*, 2000; Klijn *et al.*, 2005). Se ha comprobado que con la edad no sólo descende el número de bifidobacterias sino también la diversidad de especies. Así, las especies de *Bifidobacterium* que mayoritariamente se encuentran en personas de edad avanzada son *B. adolescentis* y *B. longum* (He *et al.*, 2001; Hopkins y Macfarlane, 2002). Por el contrario, el número de clostridios va aumentando con la edad, y en personas de edad avanzada es frecuente encontrar *Clostridium difficile*, en comparación con individuos jóvenes. En general, el recuento de anaerobios totales de muestras fecales se mantiene estable entre la población anciana, pero sí existen cambios en la composición de diferentes géneros bacterianos (Woodmansey, 2007).

Además, la microbiota intestinal no solo depende de la edad, sino de la dieta, del estrés, del consumo de medicamentos, fundamentalmente los antibióticos, etc. Estos pueden provocar desequilibrios entre las poblaciones microbianas y desencadenar un aumento de los microorganismos considerados perjudiciales. Este aumento de población microbiana no deseada puede dar lugar a alteraciones intestinales y enfermedades inflamatorias e infecciosas, por lo que es de gran importancia intervenir en la composición de la microbiota intestinal a través de alimentos o ingredientes alimentarios y aumentar el número y actividad metabólica de aquellos microorganismos considerados beneficiosos para el hospedador, como son bifidobacterias y lactobacilos (Holzapfel *et al.*, 1998).

1.3.2. Métodos de estudio de la microbiota intestinal humana.

La microbiota intestinal humana se ha investigado durante largo tiempo a través de métodos clásicos basados fundamentalmente en medios de cultivo. Sin embargo, el elevado número de cepas que no pueden ser identificadas por técnicas fenotípicas y el tiempo requerido para la realización de estas técnicas, han hecho necesaria la aparición de métodos moleculares para la identificación de las diferentes bacterias presentes en la

microbiota del TGI. A continuación se describen las principales técnicas empleadas para la detección e identificación de bacterias presentes en el TGI.

I.3.2.1. Métodos tradicionales.

El estudio de la microbiota intestinal se ha llevado a cabo tradicionalmente a través del cultivo de microorganismos en medios selectivos y pruebas fenotípicas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Los medios selectivos están basados en características bioquímicas selectivas como tolerancia al oxígeno, resistencia a antibióticos o capacidad de fermentación de diferentes substratos, así como condiciones diferenciales de crecimiento, como son el pH y la temperatura de crecimiento. El método de cultivo con medios selectivos es un método sencillo pero tiene algunos inconvenientes como son la pérdida de sensibilidad debido al empleo de antibióticos en los medios y la existencia de bacterias viables no cultivables que infravaloran el resultado obtenido.

I.3.2.2. Métodos moleculares.

Los métodos de identificación de bacterias basados en análisis genéticos están siendo una herramienta muy útil en el estudio de la microbiota intestinal humana, ya que estas técnicas tienen la ventaja de analizar la composición microbiana global sin necesidad de aislamientos previos. Las ventajas de las técnicas moleculares frente a los tradicionales medios de cultivo son la rapidez, sensibilidad y reproducibilidad. Estas técnicas moleculares están basadas en el análisis de secuencias conservadas de DNA o RNA. La mayoría de las técnicas emplean el gen 16S rRNA ya que es un gen altamente conservado y permite la comparación filogenética entre bacterias. La elección de una técnica u otra depende del objetivo que se pretenda. De este modo, para identificar la microbiota a nivel de especie podrían emplearse técnicas de clonaje o secuenciación; para estudiar la diversidad de una población microbiana se suelen emplear las llamadas técnicas de huella genética, tales como DGGE, TGGE; y para cuantificar especies o grupos taxonómicos encontramos la hibridación *dot-blot*, FISH y PCR a tiempo real o cuantitativa (Mayo *et al.*, 2008).

1.3.2.2.1. Técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR se basa en la amplificación de un gen o una parte de un gen a partir de una pequeña cantidad de DNA o RNA (previo paso a cDNA) mediante la repetición de ciclos alternos de temperaturas para la desnaturalización, unión de cebadores y extensión de la cadena mediante una enzima Taq polimerasa. El proceso permite la amplificación exponencial de una secuencia de ácidos nucleicos flanqueada por secuencias homólogas a cebadores sintéticos previamente diseñados. Es posible combinar la PCR con otras técnicas, las cuales se comentarán a continuación haciendo especial énfasis en las técnicas PCR-DGGE y PCR a tiempo real.

1.3.2.2.1.1. Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE)

La técnica DGGE fue desarrollada por primera vez en 1983 por Fischer y Lerman para la identificación de mutaciones en genes humanos. Más adelante se ha venido empleando para el análisis de poblaciones microbianas basadas en secuencias específicas del gen 16S rRNA. El fundamento de la técnica se basa en la separación electroforética de moléculas de DNA que tienen la misma longitud pero diferente secuencia nucleotídica (Lerman *et al.*, 1984). La separación en los geles de poliacrilamida se produce por un agente desnaturalizante (urea y formamida en DGGE y temperatura en TGGE) que desdobla las hebras de DNA. Para prevenir la completa disociación de las hebras se añade un anclaje de 30 a 50 bases nucleotídicas de guaninas (G) y citosinas (C) unidas al extremo 5' de uno de los cebadores. Ya que la migración de la molécula depende de su desnaturalización y a su vez de la secuencia nucleotídica, la técnica DGGE/TGGE es capaz de distinguir especies que difieran en tan sólo una base nucleotídica. Para visualizar las bandas en el perfil DGGE se puede llevar a cabo una tinción con bromuro de etidio, Sybr Green o plata. La tinción con plata es el método de detección más sensible aunque tiene el inconveniente de teñir moléculas de DNA tanto de una como de doble cadena que existan en la muestra (Muyzer y Smalla, 1998).

La intensidad de las bandas obtenidas aporta información semi-cuantitativa de la abundancia relativa de esa población en concreto. Las bandas en un gel de DGGE pueden identificarse directamente por comparación de la migración y perfil de las

bandas contra un marcador de DGGE de amplicones obtenidos con cepas bacterianas conocidas, o mediante purificación de la banda de DNA obtenida, reamplificación, secuenciación y comparación con las bases de datos existentes (Genbank). (Mayo *et al.*, 2008). La técnica PCR-DGGE se ha utilizado ampliamente para la detección e identificación de bacterias lácticas en leches fermentadas, así como para estudiar la diversidad y evolución de poblaciones microbianas en muestras fecales (Mätto *et al.*, 2005; Vanhoutte *et al.*, 2006) y en muestras de la cavidad bucal (Maukonen *et al.*, 2008).

1.3.2.2.1.2. PCR a tiempo real o cuantitativa (RTi-PCR).

En la RTi-PCR, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea, sin necesidad de ninguna acción posterior. La cantidad de DNA sintetizado en cada ciclo se mide mediante detección por fluorescencia, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad del DNA diana presente en la reacción. Los agentes fluoróforos pueden ser de dos tipos principalmente: agentes inespecíficos como el SYBR Green y sondas específicas marcadas con fluorocromos como las balizas moleculares (*molecular beacons*) y las sondas de hibridación (sistema TaqMan).

Los agentes inespecíficos son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a DNA de doble cadena. El más empleado en RTi-PCR es el SYBR Green. La optimización de las condiciones de la reacción es fácil y además es más barato que las sondas específicas. El principal inconveniente de los agentes inespecíficos, como su nombre indica, es su baja especificidad, debido a que se unen de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores, muy frecuentes en la PCR, introduciendo errores en el posterior análisis de los resultados. Para mejorar la especificidad del proceso, se deben emplear condiciones de reacción óptimas y una selección cuidadosa de los cebadores para disminuir el riesgo de formación de dímeros. Además, la mayoría de los equipos para RTi-PCR tienen la posibilidad de determinar la temperatura de fusión de los fragmentos amplificados (T_m = temperatura a la que el 50% del DNA de la molécula está desnaturalizado). Cada fragmento amplificado tiene una T_m característica, que depende sobre todo de su longitud y de la composición de sus bases. Esta aplicación permite comprobar, aunque

no siempre con absoluta garantía, la especificidad de los fragmentos detectados en la PCR.

Entre las aplicaciones de la PCR a tiempo real se encuentran, además de la cuantificación de bacterias lácticas en leches fermentadas (Furet *et al.*, 2004), la detección y cuantificación de bacterias lácticas en muestras fecales (Malinen *et al.*, 2003, 2005; Haarman y Knol, 2005, 2006) y la detección y cuantificación de patógenos en muestras fecales (Ibekwe y Grieve, 2003; Inglis *et al.*, 2004; Lund *et al.*, 2004).

Recientemente, el empleo de agentes intercalantes de DNA asociado a la RTi-PCR ha permitido diferenciar cuantitativamente entre bacterias viables y no viables. El principal criterio para distinguir entre células viables y células dañadas de manera irreversible es la integridad de la membrana. Las células viables con membranas intactas son impermeables al paso de determinados agentes intercalantes de DNA que, sin embargo, penetran fácilmente en células con las membranas dañadas. El agente más utilizado ha sido monoazida de etidio (EMA) (Nogva *et al.*, 2003). Este agente posee un grupo azida que permite la unión covalente al DNA después de un periodo de fotoinducción con luz visible (máxima absorbancia a 460 nm). Las células se exponen durante un tiempo al agente para que penetre en las células con membranas celulares dañadas y se intercale en el DNA. La fotólisis del compuesto azida genera un radical nitreno que se une covalentemente al DNA e impide su amplificación por PCR. Estudios recientes han demostrado que esta unión covalente del agente insolubiliza el DNA de células dañadas, lo que da lugar a su pérdida durante la extracción del DNA genómico (Nocker y Camper, 2006). El agente no unido que permanece libre en solución, se inactiva por fotólisis y se convierte en hidroxilamina al reaccionar con moléculas de agua, de modo que no puede unirse al DNA de células viables en la etapa posterior de lisis celular. La aplicación posterior de RTi-PCR a las muestras tratadas con EMA permite la amplificación selectiva y cuantitativa del DNA procedente sólo de bacterias con membranas celulares intactas y por tanto viables, discriminándolas así de la población de bacterias con membranas dañadas presente en la muestra. Además, la posible presencia de bacterias con membranas celulares intactas pero en un estado fisiológico inactivo que impide su cultivo en medios sólidos, podría también detectarse utilizando este método. Se ha demostrado la presencia de bacterias del género *Bifidobacterium* en este estado transitorio denominado “durmiente”, lo que podría tener implicaciones en el papel real de estos microorganismos en su efecto funcional si llegaran posteriormente a recuperar su viabilidad (Lahtineen *et al.*, 2005).

Sin embargo, el papel del EMA como agente discriminante de bacterias dañadas se ha cuestionado recientemente (Nocker *et al.*, 2006), al considerar que también puede penetrar en células intactas de algunas especies bacterianas. Estos autores proponen alternativamente la utilización del agente monoazida de propidio (PMA), resultante de la adición de un grupo azida al ioduro de propidio (PI) que se utiliza satisfactoriamente en la discriminación mediante fluorescencia de bacterias viables en el test comercial LIVE/DEAD *BacLight*. El PMA posee una carga positiva superior al EMA, lo que aumenta su impermeabilidad a la penetración en células con membranas intactas. Se ha demostrado la eficacia de este agente en la cuantificación de células viables en cultivos puros de cuatro especies de bacterias Gram negativas y cinco Gram positivas (Nocker *et al.*, 2006), de *Listeria monocytogenes* (Pan y Breidt, 2007), de hongos en muestras de aire y agua (Vesper *et al.*, 2007) y recientemente de *Bacteroidales* en muestras fecales y aguas residuales (Bae *et al.*, 2009).

1.3.2.2.1.3. DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD).

Esta técnica, descrita por Williams *et al.* (1990), se basa en la detección de diferencias en la secuencia del DNA genómico total de distintas cepas. Para ello se emplean cebadores de secuencia aleatoria que se unen al DNA amplificando así regiones al azar. La secuencia del cebador no guarda homología conocida con el DNA diana, por lo que la amplificación se realiza con una temperatura baja de unión del cebador. Así se generan fragmentos de distintos tamaños, que mediante separación en gel de agarosa proporcionan patrones de bandas distintos para aquellas cepas que presentan diferencias en sus secuencias genéticas, obteniéndose una huella genómica o *fingerprinting* característica para cada cepa. Las ventajas de esta técnica son que no es necesario tener con anterioridad información de la secuencia a amplificar y que se puede emplear con gran variedad de especies, requiriéndose poca cantidad de cultivo, además de ser una técnica rápida (no requiere digestión del producto amplificado). Por el contrario, cualquier diferencia en los ciclos de temperatura, DNA polimerasa y sus concentraciones, métodos de preparación de DNA, concentraciones de magnesio en la mezcla de reacción, etc., puede ocasionar variaciones en los perfiles de RAPD obtenidos (Satokari *et al.* (2003); Singh *et al.* (2009). Los RAPDs han mostrado ser discriminatorios a nivel de especie para diferenciar *Lactobacillus* (Ward y Timmins,

1999; Rodas *et al.*, 2005) incluso diferenciar también a nivel de cepa (Berthier y Ehrlich, 1999; Roy *et al.*, 2000).

1.3.2.2.1.4. Polimorfismo del tamaño de fragmentos de restricción (RFLP). Análisis de restricción del DNA ribosomal amplificado (ARDRA).

Estas dos técnicas se basan en la amplificación por PCR de una secuencia conocida del DNA genómico utilizando cebadores homólogos, seguido de la digestión del fragmento obtenido con una endonucleasa de restricción y la posterior comparación de los distintos patrones de bandas de restricción obtenidos. Ambas técnicas tienen como ventaja su elevada reproducibilidad. Como desventajas cabe destacar la mayor complejidad de análisis que la que se sigue con RAPDs y la obtención de una información restringida ya que únicamente se analiza una región determinada del genoma. Se han utilizado tanto RFLP como ARDRA para la identificación de especies del género *Lactobacillus* (Rodas *et al.*, 2005) y *Bifidobacterium* (Ventura *et al.*, 2001).

1.3.2.2.1.5. Secuenciación.

El método más empleado para la identificación taxonómica es la secuenciación del gen 16S rRNA. Los genes ribosomales están más conservados que la mayoría de los genómicos y por lo tanto ofrecen una mayor información taxonómica que las hibridaciones DNA-DNA. El hecho de que el gen 16S rRNA contenga a su vez regiones muy conservadas y regiones muy variables permite distinguir organismos a diferentes niveles filogenéticos. Empleando cebadores universales de regiones conservadas a ambos lados del gen, se puede amplificar mediante PCR el gen 16S rRNA directamente de las colonias crecidas en placa. El producto amplificado se secuencia y se compara con otras secuencias recogidas en las bases de datos, permitiendo así una caracterización de estirpes desconocidas. Las bases de datos donde se introducen las secuencias analizadas para su identificación incluyen más de 16000 secuencias del gen 16S rRNA (Botina *et al.*, 2006).

El análisis de la secuencia del gen 16S rRNA se emplea habitualmente para identificar la diversidad de la microbiota intestinal y establecer las relaciones filogenéticas. Esta técnica ha servido para demostrar que la microbiota fecal está compuesta mayoritariamente por los géneros *Bacteroides* y *Clostridium* (Hold *et al.*,

2002). También se emplea en la identificación de bacterias presentes en productos lácteos (Ogier *et al.*, 2002). Sin embargo, la gran similitud en la secuencia del gen 16S rRNA entre especies del mismo género, como por ejemplo ocurre con muchas especies de los géneros *Enterococcus* y *Lactobacillus*, hace que este método no siempre sea preciso para la identificación de especies muy relacionadas entre sí (Botina *et al.*, 2006). Por eso también se emplea la secuenciación de la región intergénica entre los genes del 16S y el 23S rRNA ya que contiene un gran número de genes tRNA variables (Gurtler y Stanisich, 1996; Tannock *et al.*, 1999). La secuenciación de esta región intergénica ha permitido diferenciar entre cepas pertenecientes a *L. casei* y *L. rhamnosus* (Tannock *et al.*, 1999).

1.3.2.2.2. Técnicas moleculares no basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

1.3.2.2.2.1. Hibridación dot-blot.

La técnica de hibridación *dot-blot* requiere la extracción del material genético (DNA o RNA), la fijación a una membrana de nylon o nitrocelulosa y la posterior hibridación de la membrana con una sonda que comprende una secuencia específica complementaria al material genético de la bacteria de interés. La cuantificación del RNA hibridado refleja la abundancia de la población diana pero no mide la cantidad de células ya que el RNA celular varía según las condiciones y actividad celular en el momento de la muestra (Molin y Givskov, 1999). La hibridación *dot-blot* se ha empleado para cuantificar rRNA de muestras fecales y del ciego, observándose que las poblaciones de *Clostridium leptum*, *Bacteroides* y *C. coccoides* estaban en mayor proporción en las heces que en el ciego (Molin y Givskov, 1999; Marteau *et al.*, 2001).

Existe una variedad de hibridación llamada hibridación *dot-blot* inversa que permite la detección simultánea de diferentes bacterias lácticas. Para ello se realiza primero una PCR y el producto de amplificación obtenido se hibrida con sondas específicas de especie (Ehrman *et al.*, 1994). De este modo se han analizado diversas especies de *Bifidobacterium* que se han hibridado con sondas específicas para cada especie (Laitinen *et al.*, 2002; Malinen *et al.*, 2002).

1.3.2.2.2.2. Hibridación fluorescente in situ (FISH)

Esta técnica se basa en la hibridación directa con una sonda marcada con fluorescencia y complementaria de una región de la subunidad 16S o 23S del gen RNAr. Se trata de una técnica común para la detección e identificación de microorganismos de diferentes ambientes microbianos, incluyendo comunidades mixtas (Amann *et al.*, 1995). Las sondas de fluorescencia pueden ser específicas de grupo, género o especie. La detección y cuantificación de las células se realiza mediante microscopía de epifluorescencia o citometría de flujo. (Mayo *et al.*, 2008). La citometría de flujo (FCM) ha supuesto una mejora de la sensibilidad de la detección, ya que en tan solo unos segundos se pueden obtener recuentos de miles de células. El empleo de la técnica combinada FISH y FCM ha permitido la detección y cuantificación de las bacterias mayoritarias del TGI en muestras fecales, obteniéndose una alta correlación entre los recuentos obtenidos por FCM o por microscopía (Zoetandal *et al.*, 2002a,b). FISH combinada con FCM es la técnica de detección por fluorescencia más empleada para la identificación de la diversidad bacteriana en muestras fecales habiendo obtenido resultados a nivel de especie para bacterias de los géneros *Bacteroides*, *Clostridium* y *Bifidobacterium* (Dinoto *et al.*, 2006).

El método FISH presenta la ventaja de que no necesita cultivo previo del microorganismo ni extracción de ácidos nucleicos. Mediante esta técnica se puede obtener información que no ofrecen otros métodos, como son la morfología, el número y la distribución espacial de la bacteria en el medio en que se encuentra. La mayor limitación de este método es la sensibilidad, que depende del número de ribosomas existentes, de la penetración de la sonda y de la matriz donde se hibride, ya que en muchos casos es necesario un tratamiento previo de la muestra. La técnica FISH junto con la hibridación *dot-blot* se han empleado en la enumeración de bacterias probióticas en muestras fecales con similares límites de detección en ambas técnicas, de aproximadamente 1×10^7 células por gramo fecal (Jansen *et al.*, 1999).

1.3.2.2.2.3. Microarrays.

Este procedimiento consiste en una hibridación con múltiples sondas de DNA, que representan los genes que se quieren detectar. Las sondas se inmovilizan en una membrana o matriz unida a una superficie junto al DNA de la muestra de estudio. La detección se realiza por microscopía o escáner de fluorescencia, que conectado a una

cámara controlada por ordenador permite el análisis simultáneo de RNA o DNA de miles de genes, o del mismo gen en miles de microorganismos, en un solo experimento. Algunos inconvenientes que tienen los microarrays son el alto coste de la técnica y la dificultad para cuantificar la señal de hibridación, ya que puede variar entre las diferentes especies diana (Zoetendal *et al.*, 2004).

La aplicación más frecuente de los microarrays es el estudio de la composición de poblaciones microbianas complejas ya que se pueden analizar miles de genes a la vez con un alto grado de detección (Satokari *et al.*, 2003). Otras de las aplicaciones son la monitorización de la expresión genética y la detección de mutaciones o polimorfismos (Zoetendal *et al.*, 2008). También es útil para conocer las interacciones entre microorganismos, así como la funcionalidad microbiana. Esto se ha logrado combinando los microarrays con isótopos radiactivos, de manera que exponiendo una población microbiana a un substrato marcado, y tras un periodo de incubación se puede llegar a medir la cantidad de isótopo incorporado en el RNA de la sonda (Wagner *et al.*, 2007). Uno de los últimos avances que se han llevado a cabo ha sido el diseño de microchips para el estudio de la microbiota intestinal humana (HITChips) con resultados prometedores. Con el HITChip se ha observado que la microbiota intestinal difiere entre personas jóvenes y adultas, y que existe una especificidad entre individuos aunque la microbiota en cada individuo sano se mantiene estable en el tiempo (Rajilic-Stojanovic *et al.*, 2009).

Las técnicas de microarrays complementan las llamadas técnicas de huella genética y las clásicas técnicas de hibridación, pues los microarrays no sólo muestran un patrón de composición microbiana sino que son capaces de identificar microorganismos desconocidos. Para obtener la misma información con las técnicas de huella genética se requiere mucho más esfuerzo ya que hay que identificar la banda, extraerla del gel y secuenciarla para obtener la información de un microorganismo (Wagner *et al.*, 2007).

1.3.2.2.2. Metagenómica.

La revolución genómica actual se entiende como el desarrollo de las tecnologías de secuenciación de genomas completos, lo cual ha dado un nuevo sentido al análisis de poblaciones bacterianas, ya que el conocimiento del total de los genes contenidos dentro del genoma de una especie permite estudiar características fisiológicas y ecológicas des

desconocidas hasta ahora. La metagenómica representa una aproximación totalmente nueva al estudio de las poblaciones microbianas, definida como el análisis funcional y de secuencias de los genomas microbianos colectivos contenidos en una muestra ambiental, basándose ya sea en expresión o secuenciación (Handelsman, 2004). La propiedad más valiosa de la metagenómica es la de proporcionar la capacidad de caracterizar de forma global la diversidad genética presente en dichas muestras, obviando las dificultades encontradas en el cultivo en laboratorio de determinados microorganismos. El análisis de genomas completos se hace construyendo librerías de clones. Esto conlleva la amplificación por PCR de la casi totalidad de los genes 16S rRNA y posterior secuenciación en ambas direcciones. A continuación, mediante programas informáticos, las secuencias se alinean y se genera un árbol filogenético en el que las secuencias quedan agrupadas en OTUs (unidades taxonómicas operativas). La comparación de microbiomas entre poblaciones diferentes se realiza, por tanto, comparando los datos de las librerías de clones (Li *et al.*, 2008).

Las principales ventajas de estos métodos sobre las técnicas tradicionales de amplificación genética son: un menor sesgo taxonómico en la secuenciación y la capacidad de analizar simultáneamente la taxonomía y funcionalidad de una misma comunidad. Una de las limitaciones más obvias de la metagenómica se refiere a la ausencia de estandarización en las metodologías de obtención de datos, causando una enorme heterogeneidad en la información contenida en los análisis metagenómicos (Raes *et al.*, 2007). Debido al uso de diferentes protocolos de extracción de DNA, de diferentes volúmenes de muestra, y por lo tanto del número de células por muestra y cantidad de DNA total utilizada en la secuenciación, la comparación entre metagenomas resulta actualmente muy difícil. Otro problema es la complejidad en el proceso de ensamblado del genoma o metagenoma, así como el alto coste del proceso.

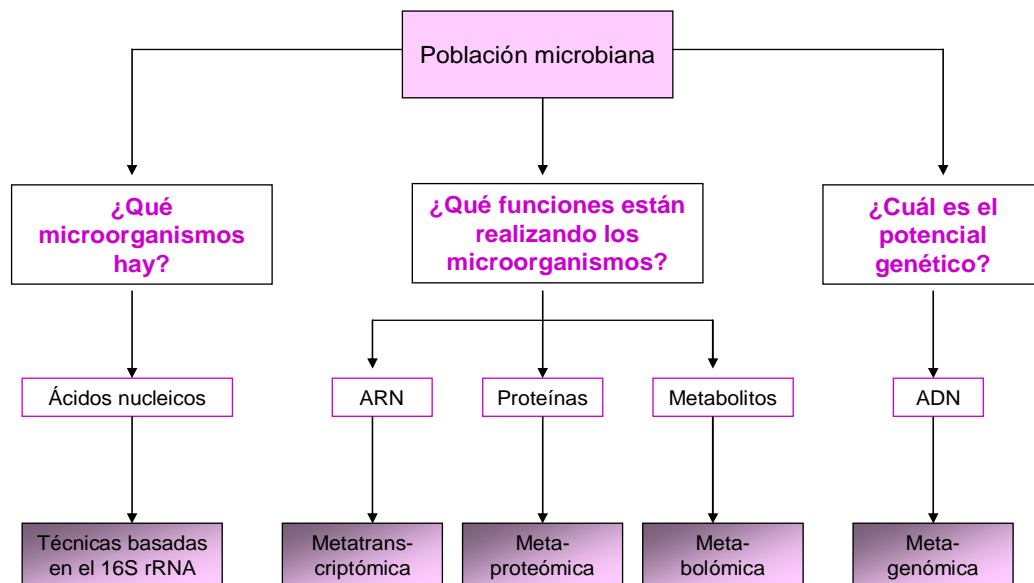


Fig. 3. Representación esquemática de las llamadas técnicas “ómicas” (Zoetendal *et al.*, 2008).

La secuencia del metagenoma de una comunidad representa el potencial funcional a disposición de la comunidad y no la verdadera funcionalidad de la misma, dado que la presencia de genes en un genoma no implica su expresión ni su traducción. Para una comprensión total de la funcionalidad bioquímica de una población, es necesario realizar análisis de expresión de RNA y medir la cinética enzimática de las proteínas más abundantes en condiciones naturales y así poder realizar conclusiones respecto a la funcionalidad real de la población, como se muestra en la Figura 3 (Zoetendal *et al.*, 2008).

Los resultados de la metagenómica proporcionan una visión más amplia de la biología humana, entre ellos, nuevos marcadores biológicos para definir el estado de salud, nuevas vías para optimizar nuestra nutrición personal, nuevas formas de predecir la biodisponibilidad de los medicamentos de administración oral y nuevos caminos para pronosticar la predisposición individual o poblacional a trastornos tales como

infecciones, colon irritable, enfermedad de Crohn, obesidad y respuestas inmunes no adecuadas que se puedan producir en el intestino (Gill *et al.*, 2006; Jia *et al.*, 2008;).

En la siguiente tabla se reúnen las diferentes técnicas de estudio de la microbiota, así como sus ventajas y limitaciones.

Tabla 3: Resumen de las técnicas empleadas para estudiar poblaciones microbianas complejas (adaptada de Zoetendal *et al.*, 2004).

Métodos	Aplicaciones	Ventajas	Inconvenientes
Medios de cultivo	Aislamiento	Barato. Recuperación de los aislados para análisis posteriores.	No representativo. Lento y laborioso.
Secuenciación	Identificación filogenética	Comparación de secuencias genéticas conservadas	Laborioso. Sujeto a sesgos debidos a la PCR.
DGGE/ TGGE/ TTGE T-RFLP	Estudio de la diversidad microbiana (“huella genética”). Seguimiento de cambios microbiológicos	Sensibilidad. Rápido análisis comparativo	Sujeto a sesgos debidos a la PCR. Semi-cuantitativa. Requiere librería de clones.
FISH	Detección, cuantificación	Análisis comparativo sin previo cultivo.	Requiere información de la
Hibridación dot-blot	Detección. Cuantificación relativa de rRNA	Exactitud. No depende de PCR. No requiere previo cultivo	secuencia y diseño de sondas. Laboriosa.
PCR cuantitativa		Rapidez, precisión	Laboriosa.
Microarrays	Expresión genética, caracterización de la composición de poblaciones complejas	Múltiple información genética con mínima cantidad de muestra. Análisis automatizado.	Alto coste. Dificultad de estandarización de la muestra.
Metagenómica	Caracterización eficaz de la diversidad genética de poblaciones complejas.	Análisis simultáneo de taxonomía y funcionalidad.	Alto coste. Difícil estandarización de metodología.

I.4. BENEFICIOS SOBRE LA SALUD ASOCIADOS AL CONSUMO DE PROBIÓTICOS

Los principales beneficios asociados al consumo de probióticos se asocian a su capacidad de afectar a la composición de la microbiota intestinal y de modular el sistema inmune con beneficios sobre la salud. Se ha propuesto que los probióticos presentan efectividad frente a diferentes patologías intestinales como diarreas, intolerancia a lactosa, enfermedades inflamatorias intestinales, e incluso un papel protector frente al cáncer. Sin embargo, no se debe extrapolar el efecto de una cepa a otras cepas de la misma especie. En la siguiente figura se esquematizan los posibles efectos beneficiosos de los microorganismos probióticos.

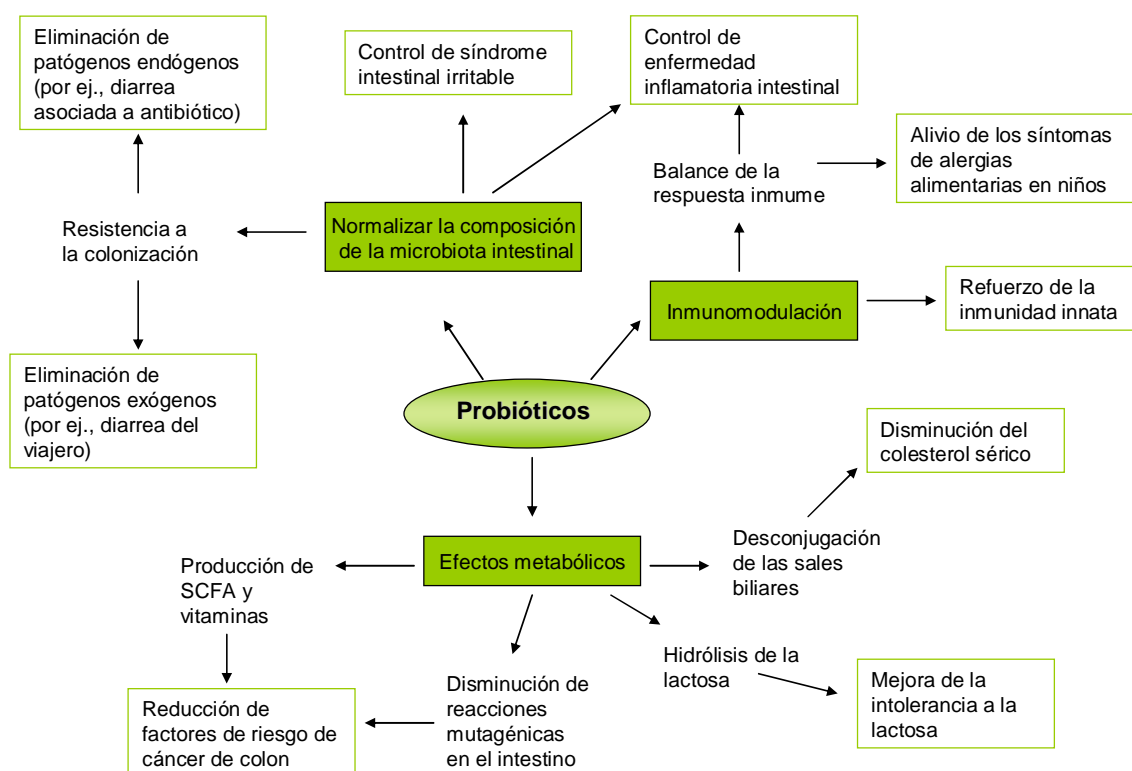


Fig. 4. Posibles efectos beneficiosos debidos al consumo de probióticos. (Adaptado de Saarela *et al.*, 2002).

Uno de los efectos beneficiosos mejor documentados de los probióticos es la mejoría de la intolerancia a la lactosa. La intolerancia a la lactosa es la incapacidad de digerir la lactosa debido a la ausencia o defecto de β -D-galactosidasa, enzima responsable de la digestión de lactosa en glucosa más galactosa, en el intestino humano. Esta ausencia de la enzima facilita que la lactosa no sea utilizada y avance a través del TGI, causando molestias abdominales, flatulencia, diarrea y otros desórdenes intestinales. El consumo de yogur o leches fermentadas probióticas favorece la tolerancia a estos productos debido a que por una parte, las bacterias lácticas empleadas como cultivos iniciadores hidrolizan la lactosa presente en el producto (*in situ*) y por otra parte, el consumo de bacterias viables hace que tras su paso por el estómago lleguen al intestino y liberen β -D-galactosidasa, capaz de hidrolizar la lactosa vía intra-intestinal (Lourens-Hatting y Viljoen, 2001; Szilagyi, 2002).

Diversos estudios experimentales han sugerido que los probióticos pueden disminuir el riesgo de padecer ciertos tipos de cánceres (Rafter, 2003; Pool-Zobel, 2005). Aunque no se conoce qué bacterias en concreto pueden estar asociadas con el riesgo de padecer cáncer colorrectal, sí parece claro que algunos grupos bacterianos presentan mayor actividad enzimática procarcinogénica que otras bacterias de la microbiota intestinal, como *Clostridium* spp (Saito *et al.*, 1992). Un posible mecanismo por el cual los probióticos ejercerían una acción anticarcinogénica sería por la inhibición de la producción de metabolitos potencialmente carcinógenos, mediante la inhibición de las enzimas bacterianas implicadas en la síntesis o activación de carcinógenos, como son nitroreductasa, azoreductasa, y β -glucuronidasa. Pero la actividad anticarcinogénica de los probióticos puede deberse también a la inhibición de ciertas bacterias que convierten procarcinógenos en carcinógenos, a la estimulación del sistema inmune y/o a la reducción del pH intestinal que a su vez reduce la actividad microbiana. Se han descrito varios estudios con efectos protectores contra el cáncer en animales, como la administración de *L. casei*, o la mezcla de *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. confusus*, *S. thermophilus*, *B. breve* y *B. longum* (Liong, 2008). El primer estudio en humanos doble ciego sobre el posible efecto de los probióticos en el cáncer de colon se llevó a cabo con un producto simbiótico y concluyeron que el producto podría ser beneficioso en personas con alto riesgo de padecer cáncer de colon (Rafter *et al.*, 2007). Sin embargo, parece crucial la dosis de probióticos empleada, ya que Wollowski *et al.* (2001)

demonstraron la pérdida del efecto protector anticancerígeno cuando disminuían la dosis de probióticos de un 90 a un 50%.

Algunos estudios realizados en animales han mostrado que ciertas bacterias probióticas son capaces de disminuir los niveles de colesterol sérico. Uno de los posibles mecanismos de acción se debe a que ciertas bacterias tienen la capacidad de desconjugar las sales biliares, lo cual hace más fácil su precipitación y posterior excreción en heces. La disminución de colesterol sérico se debería por tanto, a su eliminación a través de las heces y a la necesidad de síntesis en el hígado de más sales biliares a partir del colesterol. Sin embargo, la mayoría de los efectos observados en cuanto a la disminución de colesterol por parte de los probióticos se refieren a estudios *in vitro*, y muchos estudios realizados en humanos ponen en duda que los probióticos sean efectivos en la reducción del colesterol (Greany *et al.*, 2008). Además, la mayoría de los estudios *in vivo* en los que se han observado efectos asociados a la disminución del colesterol se han llevado a cabo en personas con hipercolesterolemia, por lo que existen pocas evidencias científicas sobre el efecto de los probióticos en personas con niveles normales de colesterol (Klein *et al.*, 2008).

1.4.1. Modulación del sistema inmune

El sistema inmune comprende el sistema inmune adquirido o específico y el sistema innato o inespecífico. El sistema inmune adquirido consta principalmente de los linfocitos B y T, mientras que el sistema inmune innato está formado por los macrófagos y las células “*natural killer*” (NK). El grado de implicación de un sistema u otro en una infección depende de las características de la infección, así como de los microorganismos implicados y el lugar de la infección (Nomoto, 2005). El sistema inmune intestinal constituye la parte más extensa y compleja de todo el sistema inmune ya que al estar en contacto con el exterior recibe un gran número de antígenos. Por lo tanto, parece también evidente que las bacterias probióticas puedan interactuar con el sistema inmune intestinal afectando así a la salud del hospedador.

Durante los últimos años, se ha estudiado el efecto que las bacterias probióticas pueden tener sobre la modulación de reacciones inmunes en personas con diversos tipos de alergias como eccemas, asma y otras alergias. Los mecanismos de acción por los que los probióticos interactúan con el sistema inmune intestinal, aunque no se conocen

con exactitud, se basan en la producción de inmunoglobulinas específicas de tipo A (Rinne *et al.*, 2005), la activación de células NK (Gill *et al.*, 2001; Ogawa *et al.*, 2006) y el mantenimiento del equilibrio entre citoquinas pro- y antiinflamatorias (Isolauri *et al.*, 2001).

En un reciente estudio, Klein *et al.* (2008) demostraron que la administración de bacterias probióticas a personas sanas afectaba a la respuesta inmune innata mediante el incremento de la actividad fagocítica pero no producía ningún cambio en parámetros de la respuesta inmune específica o adquirida. Uno de los productos más comercializados en España, Actimel, en cuya composición se encuentra *L. casei* DN114001, debe su popularidad a los efectos sobre el reforzamiento del sistema inmune innato o inespecífico, ya que se ha observado un aumento de la actividad de las células NK y de la actividad fagocítica de los macrófagos (Parra *et al.*, 2004). Otras cepas que también están asociadas con un efecto beneficioso sobre el sistema inmune (inmunidad innata) en personas sanas que consumen esos probióticos son *L. casei* Shirota, *L. rhamnosus* HN001 y *B. lactis* HN019 (Borchers *et al.*, 2009).

Existen pruebas que apoyan la eficacia de los probióticos en el tratamiento del eccema en los niños (Kalliomaki *et al.*, 2001), aunque el efecto podría no ser de gran significación clínica y se necesitan más estudios que confirmen estos resultados (Kukkonen *et al.*, 2007; Kopp *et al.*, 2008; Adlerberth *et al.*, 2007). Mientras parece que existen evidencias tanto *in vitro* como en estudios con animales de que los probióticos tienen una capacidad inmunomoduladora específica de cepa, los resultados de estudios en humanos son todavía inconsistentes (Borchers *et al.*, 2009).

En lo que respecta a procesos respiratorios como la rinoconjuntivitis y el asma, los trabajos realizados hasta ahora sugieren que los probióticos no desempeñan un papel importante en el tratamiento de tales procesos (Boyle y Tang, 2006).

I.4.2. Alteraciones intestinales

I.4.2.1. Inflamatorias.

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y el síndrome del intestino irritable (SII) son las principales alteraciones intestinales de carácter crónico en los países desarrollados (McFarland, 2008). La enfermedad inflamatoria intestinal consta

principalmente de dos formas: la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. Ambas son enfermedades crónicas con periodos agudos y de remisión. No se conoce la etiología de este tipo de enfermedades aunque comprenden factores genéticos, ambientales e inmunológicos. En general, los pacientes con EII y SII se caracterizan por una alteración del balance microbiológico intestinal, por lo que la reposición de bacterias beneficiosas se considera una buena estrategia potencial de tratamiento. Se han realizado numerosos ensayos clínicos aleatorizados con suplementos de probióticos en pacientes con EII. Respecto a la colitis ulcerosa, los probióticos han demostrado ser efectivos en al menos uno de los siguientes criterios: en la mejora clínica y endoscópica y en el descenso de la expresión de citocinas proinflamatorias (Guslandi, 2003; Kato *et al.*, 2004; Tursi *et al.*, 2004; Furrie *et al.*, 2005). En este sentido, existen resultados positivos con *Saccharomyces boulardii*, *E. coli* Nissle 1917 y VSL#3 (una preparación que contiene *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis* y *S. thermophilus*) (Borschers *et al.*, 2009).

También se han realizado estudios de tratamiento antiinflamatorio mediante la reducción de citoquinas pro-inflamatorias a partir de ensayos *ex vivo* con co-cultivos de biopsias de mucosa intestinal inflamada y determinadas cepas de *L. casei* (Borruel *et al.*, 2002). De manera similar, la suplementación en pacientes con EII de *Bifidobacterium infantis* 35624 o *L. rhamnosus* GR-1 junto a *L. reuteri* RC-14 disminuyó la producción de citoquinas IL-12 y normalizó el ratio IL-10/IL-12 (O'Mahony *et al.*, 2005; Lorea Baroja *et al.*, 2007).

En lo que se refiere a la enfermedad de Crohn, los ensayos clínicos más extensos con probióticos no han demostrado en general mejores resultados que con placebo (Prantera *et al.*, 2002; Marteau *et al.*, 2006). Guslandi *et al.* (2000) observaron una mejoría clínica con el uso de *S. boulardii* en estudios comparativos con placebo y mesalazina, que posteriormente no han sido confirmados en otros estudios con *L. rhamnosus* GG (Prantera *et al.*, 2002), lo que refuerza la necesidad de realizar estudios específicos con diversas cepas de probióticos para evaluar su potencial eficacia en el tratamiento de alteraciones intestinales crónicas. Las conclusiones derivadas de un metanálisis sobre ensayos clínicos aleatorizados ciegos y controlados con placebo que empleaban probióticos para el tratamiento de SII (McFarland y Dublin, 2008) indican que no se han realizado todavía suficientes ensayos con ningún probiótico para concluir la efectividad de alguno de ellos en el tratamiento de enfermedades intestinales crónicas. También se indica que existe una necesidad de llevar a cabo ensayos clínicos

que incluyan un número elevado de pacientes que permitan detectar diferencias significativas entre los grupos de intervención, así como la realización de múltiples ensayos que tengan en común las mismas cepas de probióticos en estudio y compartan las metodologías de seguimiento de la evolución de los pacientes.

I.4.2.2. Infecciones.

Las enfermedades infecciosas son todavía uno de los grandes problemas del siglo XXI. Las alteraciones intestinales infecciosas causadas por *Shigella*, *Vibrio cholera*, *E. coli* enteropatógena, *Campylobacter* y rotavirus, son las principales causas de muerte en los países en desarrollo (Nomoto, 2005).

Las evidencias sobre los beneficios del empleo de probióticos en alteraciones intestinales de presentación aguda parecen ser las mejor documentadas, como es el caso de la potencial eficacia del empleo de lactobacilos y bifidobacterias para el tratamiento de diarrea por rotavirus en niños (Guandalini *et al.*, 2000; Shu *et al.*, 2001; Chouraqui *et al.*, 2004). Las bacterias más estudiadas en este tipo de trastornos son *L. rhamnosus* GG, *L. casei* Shirota, *L. reuteri*, *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 y *S. boulardii* (De Vrese y Schrezenmeir, 2008). Entre los beneficios observados se encuentran: una disminución de la recurrencia en infecciones, una disminución de la duración de los síntomas o un aumento de la producción de anticuerpos específicos para rotavirus. Lomax y Calder (2009) han comparado 28 estudios clínicos sobre el efecto que tienen los probióticos en la diarrea aguda en niños, de los cuales 22 demuestran una reducción en la duración de la diarrea. Sin embargo, el efecto en adultos parece menos claro, así como en otro tipo de infecciones, por ejemplo la diarrea del viajero. Los resultados existentes son inconsistentes debido, en parte, al país donde se viaje, a las diferentes cepas probióticas, la microbiota local, los hábitos del viajero, etc. (De Vrese y Schrezenmeir, 2008).

La infección por *Helicobacter pylori* se trata de un problema de salud pública, ya que tiene una prevalencia alrededor de 70-90% en los países desarrollados. El tratamiento de la infección consiste en una triple terapia de antibióticos que consigue erradicar la infección en la mayoría de los casos, pero un 10-45% de la población no llega a erradicar la bacteria, pudiendo dar lugar al desarrollo de gastritis crónica, úlceras pépticas e incluso cáncer gástrico (Chey y Wong, 2007). Algunos estudios señalan que ciertas cepas probióticas tienen un importante papel en el control de la infección por *H.*

pylori, ya que aunque no erradiquen al patógeno sí inhiben su crecimiento y reducen la inflamación gastroduodenal (Boonyaritichai *et al.*, 2009). Las cepas más frecuentemente utilizadas en la erradicación del microorganismo en gastritis son *L. johnsonii* La1, *L. casei*, *L. brevis* y *L. gasseri* (Lesbios-Pantoflickova *et al.*, 2007). Sachdeva y Nagpal (2009) han llevado a cabo recientemente un meta-análisis de los estudios clínicos más relevantes sobre el efecto de las leches fermentadas en la erradicación de *Helicobacter pylori*. De 146 estudios, diez ensayos clínicos aleatorizados y controlados fueron seleccionados y de todos ellos se concluyó que los probióticos incluidos en productos lácteos fermentados mejoran la erradicación de *H. pylori* en un 10% y disminuyen los efectos adversos a la terapia de erradicación.

I.4.2.3. Diarrea asociada a tratamiento antibiótico.

Uno de los efectos terapéuticos más estudiados de los probióticos es la prevención de aparición de diarrea después de una terapia antibiótica. El empleo de antibióticos origina desequilibrios de la microbiota intestinal con la consiguiente pérdida de las funciones fisiológicas que ejercen una reducción del metabolismo de carbohidratos y un descenso de los SCFA (diarrea osmótica), y la pérdida de la “resistencia a la colonización” con la aparición de patógenos oportunistas (diarrea toxigénica/invasora). La diarrea asociada a antibióticos es un problema muy común que ocurre en torno a 5-35% de las personas que están bajo tratamiento antibiótico, aunque las cifras varían dependiendo de la población en estudio así como del tipo de antibiótico suministrado (McFarland, 2008). Los antibióticos con mayor riesgo de provocar DAA son: ampicilina, amoxicilina/clavulanato, clindamicina y cefalosporinas (Owens, 2008). En general, los antibióticos de amplio espectro, concretamente los que afectan a la microbiota anaerobia, están asociados con un mayor índice de DAA, así como aquellos antibióticos que son difícilmente absorbidos en el colon o secretados en la bilis (McFarland, 2008). En cuanto a la población afectada por la DAA, la edad supone un factor de riesgo debido a los cambios que se producen en la microbiota intestinal en personas de edad avanzada. En la Figura 5 se esquematizan, a modo de resumen, los principales cambios ocurridos en la microbiota del TGI de personas mayores tras una terapia antibiótica.

El aumento de los géneros *Fusobacterium*, *Clostridium* y *Eubacterium* y la disminución de los géneros *Bifidobacterium* y *Bacteroides* está relacionado con la

reducción de la funcionalidad del sistema inmune en el TGI, y con un aumento de la susceptibilidad a infecciones intestinales (Woodmansey, 2007). Las fusobacterias son capaces de dar lugar a productos de fermentación finales altamente tóxicos, como indoles y amonio. El género *Clostridium* contiene numerosas especies patógenas. Se trata de un género muy heterogéneo con requerimientos nutricionales muy diversos. La mayoría de los estudios existentes indican que hay un aumento de los clostridios en la población de edad avanzada tras un tratamiento con antibióticos. En cuanto a las eubacterias, muchas de ellas están relacionadas filogenéticamente con los clostridios, y en general tienen también unos requerimientos nutricionales complejos. Están relacionadas con la transformación de ácidos biliares en metabolitos potencialmente tóxicos para el intestino (Woodmansey, 2007).

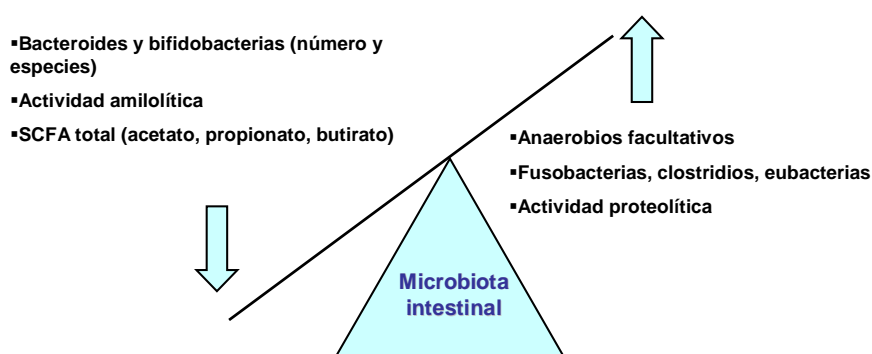


Fig. 5. Cambios principales en la microbiota intestinal de la población anciana bajo tratamiento antibiótico. (Adaptado de Woodmansey, 2007).

Las causas que originan la DAA, aparte del desequilibrio de la microbiota intestinal del individuo, son desconocidas. Se estima que *C. difficile* es el agente infeccioso responsable de 25-33% de episodios de DAA (Dubberke y Wertheimer, 2009). Esta bacteria produce dos exotoxinas, A y B, que son las responsables de los síntomas de la enfermedad. Aunque no todos los casos de DAA se deben a *C.*

difficile, la mayoría de las infecciones por *C. difficile* sí se deben al tratamiento con antibióticos (Rohde *et al.*, 2009).

La terapia más efectiva contra la DAA es la interrupción del tratamiento antibiótico o el empleo de metronidazol cuando existe infección por *C. difficile*. Debido al efecto que ejercen los probióticos sobre la microbiota intestinal, una de las terapias alternativas para la prevención de la DAA consiste en la administración de probióticos a personas que estén bajo tratamiento antibiótico. Los probióticos más estudiados en este tipo de trastorno son *L. acidophilus*, *L. casei*, *Bifidobacterium* spp. y *S. boulardii* (Pham *et al.*, 2008).

Existen diferentes estudios que afirman que la administración de ciertas bacterias probióticas antes y durante el tratamiento antibiótico reduce la frecuencia y duración de los síntomas de la DAA en muchos casos, pero no siempre es efectiva. En la tabla 4 se muestran los estudios más recientes sobre el efecto de probióticos en la DAA, todos ellos doble ciegos y controlados con placebo.

La efectividad de *S. boulardii* en la prevención de DAA ha sido la más demostrada tanto en niños como en adultos. Existen dos meta-análisis en los que se han estudiado numerosos trabajos sobre el efecto protector de *S. boulardii* en DAA en adultos (Cremonini *et al.*, 2002; D'Souza *et al.*, 2002). Posteriormente, Mehmet *et al.* (2006) demostraron que *S. boulardii* es capaz de prevenir la DAA en un estudio doble ciego controlado con placebo y con un total de 151 adultos. En cuanto a niños, Kotowska *et al.* (2005) llevaron a cabo el primer estudio clínico doble ciego, aleatorizado y controlado por placebo con 269 niños en el que concluyeron que *S. boulardii* es efectivo en la reducción del riesgo de padecer DAA.

Sin embargo, los resultados sobre *Lactobacillus* GG parecen menos claros y contradictorios. Thomas *et al.* (2001) estudiaron el efecto de *Lactobacillus* GG en una dosis de 2×10^{10} ufc/día en adultos bajo tratamiento antibiótico con β -lactámicos. El estudio se realizó sobre un total de 267 pacientes, quienes fueron aleatoriamente incorporados al grupo de placebo o de probióticos. Los resultados no mostraron ninguna diferencia entre grupos en cuanto al número de diarreas. A diferencia de este estudio en el que *Lactobacillus* GG no es efectivo frente a la DAA, existen estudios que sí demuestran una reducción de la incidencia y duración de la DAA, como Ruszczynski *et al.* (2008). En este trabajo, se observó una disminución de diarreas en aquellos niños que consumían 2×10^{10} ufc/día de *L. rhamnosus* GG bajo

tratamiento antibiótico con penicilinas de amplio espectro, con respecto a los niños que consumían placebo, en un total de 240 niños.

Existe la hipótesis de que *Lactobacillus* GG pueda ser efectivo sólo con ciertas clases de antibióticos, como por ejemplo las penicilinas, e inefectivo con los β -lactámicos empleados en el estudio de Thomas *et al.* (2001). El éxito de los probióticos en niños puede estar asociado en general a este aspecto, ya que la penicilina es un antibiótico preferiblemente administrado en niños y menos común en adultos (Thomas *et al.*, 2001).

Otros trabajos han demostrado que el consumo de mezclas de diferentes cepas probióticas previene o reduce la DAA tanto en niños (Correa *et al.*, 2005) como en adultos (Orrhage *et al.*, 2000; Beausoleil *et al.*, 2007; Wenus *et al.*, 2008) y ancianos (Hickson *et al.*, 2007). El estudio de Hickson *et al.* (2007) es de los más extensos en cuanto al número de población estudiada, ya que evaluaron el efecto de una bebida compuesta por *L. casei*, *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* sobre un total de 135 personas de edad avanzada bajo tratamiento antibiótico y aleatorizadas en un estudio doble ciego controlado con placebo. El 12% de las personas del grupo probiótico desarrolló DAA comparada con el 34% del grupo placebo.

Sin embargo, hay estudios que demuestran que no existe una efectividad de los probióticos con respecto al placebo en la DAA. Szymanski *et al.* (2008) y Safdar *et al.* (2008) estudiaron el efecto de diferentes cepas probióticas en niños y ancianos, respectivamente, sin encontrar mejoría por parte de los probióticos en la DAA. Uno de los trabajos con mayor número de personas en estudio lo llevaron a cabo Conway *et al.* (2007), en el que 407 personas (tanto niños como adultos) participaron en un estudio doble ciego controlado por placebo y aleatorizado. Los resultados mostraron que no existían diferencias significativas en el número de personas que desarrollaron diarreas pertenecientes a un grupo u otro.

Algunos autores afirman que la mezcla de bacterias probióticas en un mismo producto ofrece mayores beneficios que una sola especie, aunque la mayoría de los trabajos se centran en resultados clínicos únicamente. Recientemente se ha elaborado un estudio clínico sobre el efecto en DAA de una leche fermentada con múltiples cepas probióticas de diferentes especies en el que además se han analizado parámetros bioquímicos y microbiológicos (Koning *et al.*, 2008). El producto estaba compuesto por 10 especies diferentes en una dosis total de 10^{10} ufc/g, y se llevó a cabo sobre 41 personas adultas bajo tratamiento con amoxicilina. Los resultados

mostraron que no existían diferencias significativas entre los grupos placebo y probiótico en la composición y actividad enzimática de la microbiota, aunque las diferencias a lo largo del tiempo sí eran diferentes entre ambos grupos. Esto se complementó con una significativa aunque ligera disminución de los episodios diarreicos que se observaron en aquellas personas que tomaron el producto probiótico.

En definitiva, existe una gran variabilidad en los estudios clínicos que existen en cuanto al microorganismo probiótico empleado, dosis y duración del tratamiento, grupos participantes (número de participantes, edad, sexo, estado de salud) y definición de diarrea y recurrencia. Hacen falta más estudios que combinen parámetros bioquímicos, microbiológicos y clínicos con un alto número de participantes, para poder establecer conclusiones acerca del efecto específico de un probiótico sobre la DAA.

Tabla 4. Estudios sobre el efecto de los probióticos en la diarrea asociada a antibióticos (DAA).

Estudio	Probiótico (s) empleado	Número de participantes	Efecto probiótico	Tipo de análisis realizado
Thomas <i>et al.</i> (2001)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	267 adultos	No existen diferencias significativas ¹	Clínico
Ruszczyński <i>et al.</i> (2008)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	240 niños	Disminución del riesgo de DAA	Clínico
Kotowska <i>et al.</i> (2005)	<i>S. boulardii</i>	269 niños	Disminución del riesgo de DAA	Clínico
Mehmet <i>et al.</i> (2006)	<i>S. boulardii</i>	151 adultos	Prevención de la DAA	Clínico
Corrêa <i>et al.</i> (2005)	<i>B. lactis</i> + <i>S. thermophilus</i>	80 niños	Disminución de la DAA	Clínico
Szymanski <i>et al.</i> (2008)	<i>B. longum</i> + <i>L. rhamnosus</i>	78 niños	No existen diferencias significativas	Clínico
Conway <i>et al.</i> (2007)	<i>L. acidophilus</i> + <i>B. lactis</i>	407 adultos y niños	No se observa prevención de DAA	Clínico
Orrhage <i>et al.</i> (2000)	<i>B. longum</i> + <i>L. acidophilus</i>	30 adultos	Disminución de la incidencia de <i>C. difficile</i>	Clínico y microbiológico
Beausoleil <i>et al.</i> (2007)	<i>L. acidophilus</i> + <i>L. casei</i>	89 adultos	Prevención de la DAA	Clínico
Koning <i>et al.</i> (2008)	10 especies	41 adultos	Ligera reducción de diarreas	Clínico, microbiológico y bioquímico
Wenus <i>et al.</i> (2008)	LGG + <i>L. acidophilus</i> + <i>Bifidobacterium</i>	63 adultos	Disminución de DAA	Clínico
Hickson <i>et al.</i> (2007)	<i>L. casei</i> + <i>L. bulgaricus</i> + <i>S. thermophilus</i>	135 ancianos	Disminución de la incidencia de la DAA y de <i>C. difficile</i>	Clínico
Safdar <i>et al.</i> (2008)	<i>L. acidophilus</i>	40 ancianos	Disminución no significativa de la DAA	Clínico

II. OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO

La alimentación ejerce una gran influencia sobre el estado de salud en el hombre, tanto por el aporte de los nutrientes necesarios como por el de determinados ingredientes que supuestamente le proporcionan efectos beneficiosos. Algunos de estos ingredientes son las bacterias probióticas, entre las que destacan bifidobacterias y lactobacilos. Los efectos beneficiosos de estos microorganismos presentes habitualmente en el intestino se basan en último término en el mantenimiento del equilibrio existente en la microbiota intestinal, mediante el reforzamiento de la barrera intestinal, la modulación de la respuesta inmune o el antagonismo con patógenos, bien por la producción de compuestos antimicrobianos, prevención de la adhesión de bacterias patógenas a los enterocitos o ventaja competitiva en la utilización de carbohidratos prebióticos o en los sitios de unión a la mucosa intestinal.

En diversas situaciones, a veces causadas por determinados tratamientos, se producen alteraciones importantes de la microbiota intestinal beneficiosa que conlleva una pérdida sensible del balance microbiano intestinal. Dentro de estos casos se encuentra la diarrea asociada al tratamiento con antibióticos. Se plantea la hipótesis de que la ingesta de alimentos portadores de bifidobacterias y lactobacilos podría actuar como coadyuvante en el tratamiento de esta alteración intestinal, agilizando la recuperación de los individuos y reduciendo la agresividad de los tratamientos.

En este sentido, el objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido evaluar los mecanismos por los que bifidobacterias y lactobacilos influyen en el equilibrio de la microbiota intestinal y establecer su posible repercusión en la evolución de la

diarrea asociada al tratamiento antibiótico. Para la consecución de este objetivo se ha llevado a cabo el siguiente plan de trabajo:

1. Determinación de la viabilidad de las bacterias probióticas en leche fermentada.
2. Caracterización molecular de las cepas probióticas para facilitar su posterior identificación en el tracto intestinal.
3. Determinación de la capacidad de las cepas probióticas para competir en el tracto gastrointestinal mediante análisis de la inhibición de adhesión de patógenos, el metabolismo fermentativo y la producción de sustancias antimicrobianas.
4. Evaluar la eficacia de las cepas probióticas suministradas en leche fermentada para reducir la diarrea asociada a tratamiento antibiótico y establecer la relación existente con su capacidad de colonización intestinal.

III. CUANTIFICACIÓN SELECTIVA E IDENTIFICACIÓN DE CULTIVOS MIXTOS DE *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L.* *acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* y *Bifidobacterium lactis* EN LECHE FERMENTADA

Artículo publicado en *International Dairy Journal*

Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk

R. Tabasco, T. Paarup, C. Janer, C. Peláez, T. Requena*

Department of Dairy Science and Technology, Instituto del Frío (CSIC), Jose Antonio Novais 10, 28040 Madrid, Spain

Received 11 October 2006; accepted 19 January 2007

Abstract

This study describes selective plating methodologies for enumeration of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk based on selective antibiotic-free media. Enumeration of *S. thermophilus* was performed using M17-lactose. MRS-fructose was suitable for enumeration of *L. bulgaricus* and MRS-maltose for differentiation between *L. acidophilus* and *L. paracasei*. The selective enumeration of *B. lactis* was obtained using MRS-raffinose containing 0.05% LiCl. The bacterial counts obtained using selective methods were equivalent to those under optimum culture conditions at a probability level of 95%. Performance of the methods was verified in fermented milk products where identification of the enumerated species was confirmed by species-specific polymerase chain reaction. This study shows that combination of species-specific polymerase chain reaction (PCR) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis has great detection and identification potential for verification of accurate species labelling in fermented milk without prior isolation of the bacteria.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Selective methods; Lactobacilli; Bifidobacteria; Fermented milk; PCR-DGGE

1. Introduction

The CODEX standard for fermented milk products (CODEX STAN 243-2003) establishes them as the products obtained by fermentation of milk by the action of suitable starter microorganisms that should be viable, active and abundant in the product to the date of minimum durability (Codex Alimentarius Commission, 2003). The name yoghurt should be used when the milk is only fermented by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Regarding viability, the norm specifies that the sum of microorganisms constituting the starter culture should be at least 10^7 cfu g⁻¹, and that minimum counts of other labelled microorganisms should

be 10^6 cfu g⁻¹. Therefore, microbial viability and authenticity are prominent criteria to be analytically verified for the compliance of fermented milk with the required product specifications. Likewise, probiotics are defined as live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit in the host (FAO/WHO, 2002). However, the minimum amount of probiotics needed to obtain a clinical effect has not been established. As more information on probiotics is available, it seems likely that numbers will vary as a function of the strain and the health effect desired (Roy, 2005).

Fermented milk products are the most popular means of delivering probiotic bacteria in food. Among them, strains of *L. acidophilus*, *L. casei* complex and *Bifidobacterium lactis* predominate in commercial probiotic products (Fasoli et al., 2003; Gueimonde et al., 2004; Masco, Huys, De Brandt, Temmerman, & Swings, 2005; Yeung, Sanders,

*Corresponding author. Tel.: +34 915492300; fax: +34 915493627.
E-mail address: requena@if.csic.es (T. Requena).

Kitts, Cano, & Tong, 2002). The presence of multiple and closely related species in these products makes the differential enumeration of probiotic and yoghurt starter bacteria difficult due to similarity in growth requirements and overlapping biochemical profiles of the species. Numerous media have been proposed for selective and differential enumeration of lactobacilli and bifidobacteria in mixed bacterial populations, and some have been the subject of specific reviews (Charteris, Kelly, Morelli, & Collins, 1997; Shah, 2000; Roy, 2001; Coeuret, Dubernet, Bernardeau, Gueguen, & Vernoux, 2003) and of comparative performance analyses (Payne, Morris, & Beers, 1999; Talwalkar & Kailasapathy, 2004; Masco et al., 2005; Van de Castele et al., 2006). In order to cover a high spectrum of species, most media for selective enumeration of mixed cultures have complex compositions that include antibiotics as selective ingredients, which could impact on the response of not only the sensitive strains but also of target bacteria and result in inaccurate or irreproducible quantitative results. A comparison of methods described in literature (Talwalkar & Kailasapathy, 2004) concluded that no reliable techniques are yet developed to accurately enumerate *L. acidophilus*, *L. casei* and *Bifidobacterium* in different commercial yoghurts. Overall, it seems rational that the choice of selective methods should focus on the type of food and the species, even strains, to enumerate in each particular situation (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001; Sartory, 2005).

As previously stated, identification of species is another important issue to be verified for the compliance of fermented milk with the required product specifications in terms of accurate species labelling and, if appropriate, to support health claims that could be associated with added probiotics. Phenotypic methods alone are inadequate for identification of lactobacilli and bifidobacteria species (Dellaglio & Felis, 2005). To achieve a rapid and reliable identification of species, polymerase chain reaction (PCR)-based methods using species-specific primers targeting the 16S rRNA gene sequence diversity have become very popular (Coeuret et al., 2003). In addition, culture-independent methods for bacterial identification based on genetic analysis have become a valuable tool, since these techniques have the advantage to analyze the product as a whole. Separation of genus or species-specific PCR products by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) has become the most commonly used technique among the culture-independent methods for detection and identification of lactobacilli and bifidobacteria from fermented products (Ercolini, 2004).

The aim of this study was to develop selective plating methodologies for enumeration and identification of mixed cultures of *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *B. lactis* in fermented milk products based on selective antibiotic-free media and different incubation conditions. To evaluate the performance of selective media for complete recovery of viable bacteria, methods were validated on the basis of

their precision, accuracy, reproducibility, selectivity and specificity characteristics, in relation to culture conditions, which were used as reference methods. Efficacy of the selective methods was verified by identification of the presumptive colonies using species-specific PCR. The study is also complemented with the application of a culture-independent procedure based on PCR–DGGE analysis to the rapid detection and identification of the mixed species in fermented milk products.

2. Material and methods

2.1. Microorganisms and culture conditions

Strains used in the assay were *S. thermophilus* STY-31, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBY-27, *L. acidophilus* LA-5, *L. paracasei* subsp. *paracasei* LC-01, and *B. lactis* BB-12. The strains were purified from a commercial synbiotic product (Simbiotic Drink; Priégola, Madrid, Spain). To allow the correct identification of strains, 16S rRNA gene nucleotide sequencing was carried out from pure cultures. The entire gene was amplified using the primers *SacI*-POmod and *SalI*-T7-PC5 (Table 1) and the PCR conditions described previously by Rodtong and Tannock (1993). Additional primers used to assist in sequencing were 16Smidfor and P3rev (Table 1). Sequencing of PCR fragments was carried out for both strands at the DNA Sequence Service of the Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC (Madrid, Spain). *S. thermophilus* was grown in M-17 broth (Pronadisa, Madrid, Spain) containing 2% lactose. *Lactobacillus* subsp. and *B. lactis* were grown under anaerobic conditions (Gas-Pack, Anaerogen; Oxoid Ltd., Hampshire, England) in MRS broth (Pronadisa) supplemented with 0.05% L-cysteine hydrochloride, excepting *L. paracasei* subsp. *paracasei* that was grown aerobically in MRS broth. Incubations were carried out for 18–24 h at 37 °C and at 30 °C for *L. paracasei* subsp. *paracasei*.

2.2. Selective methods

Culture conditions described above were selected as reference methods. Media were supplemented with 1.5% bacteriological agar (Scharlab, Barcelona, Spain) and incubation extended to 48 h for *S. thermophilus* and 72 h for *B. lactis* and lactobacilli.

The selective conditions for the enumeration of *S. thermophilus* included inoculation of appropriate dilutions by the pour-plate technique into M-17 agar containing 1% lactose (M17-lactose) and incubation at 45 °C for 24 h. For enumeration of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, appropriate dilutions were pour-plated into MRS fermentation broth (Pronadisa), which does not contain either glucose or meat extract (De Man, Rogosa, & Sharpe, 1960), enriched with 0.2% Tween 80 and supplemented with 1% fructose, 0.8% casein acid hydrolysate, 0.05% cysteine, and 1.5% agar (MRS-fructose). Plates were incubated in anaerobic

Table 1

Polymerase chain reaction primers used in this study for the identification of *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *B. lactis*

Species	Name	Sequence 5' → 3'	Product (bp)
<i>S. thermophilus</i>	Thermfor	ACGCTGAAGAGAGGAGCTTG	157
	Thermrev	GCAATTGCCCCTTTCAAATA	
<i>L. bulgaricus</i>	Bulgfor	TCAAAGATTCTTCGGGATG	232
	Bulgrev	TACGCATCATTGCCTTGTA	
<i>L. acidophilus</i>	Acidfor	AGCGAGCTGAACCAACAGAT	227
	Acidrev	AGGCCGTTACCCTACCAACT	
<i>L. paracasei</i>	Casfor	GCACCGAGATTCAACATGGAA	142
	Casrev	GCCATCTTTCAGCCAAGAACC	
<i>B. lactis</i>	Forlac	GCGCTGGGCTGCTCTGGAAGC	116
	Revlac	TGGCGACGAGCTCATCGACATACT	
All species	<i>SacI</i> -POmod	CCGAGCTCAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	792–825 ^a
	P3rev	GGACTACCAGGGTATCTAAT	767–771 ^a
	16Smidfor	GGCCGTTACTGACGCTGAG	
	<i>SacI</i> -T7-PC5	GGTCGACCGTTAATACGACTCACTATAGGGATACCTTGTTACGACTT	

^aSize range of products obtained from the five species.

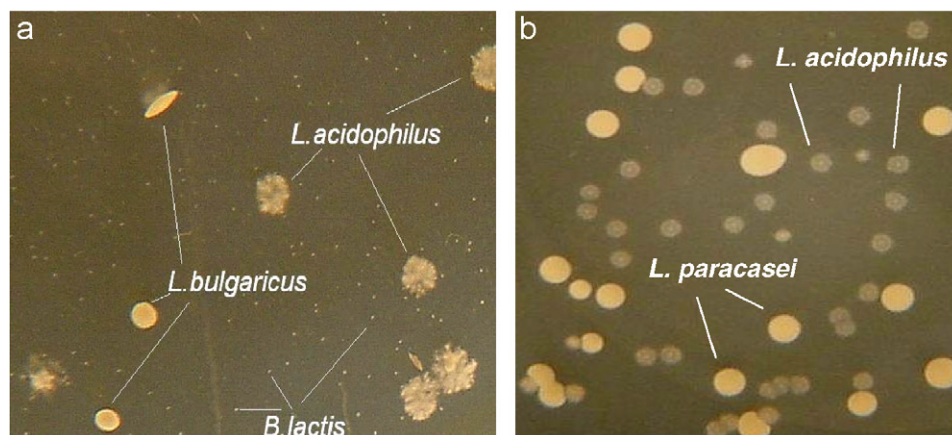


Fig. 1. Differentiation of *L. acidophilus* from *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *B. lactis* on MRS-fructose agar (a) and from *L. paracasei* subsp. *paracasei* on MRS-maltose agar (b).

jars at 45 °C for 72 h and lenticular colonies with 1–2 mm diameter were enumerated as *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, whereas cottony–fluffy colonies of 2–3 mm diameter corresponded to *L. acidophilus* (Fig. 1a). Enumeration of *L. acidophilus* was performed by spreading out appropriate dilutions onto MRS fermentation broth enriched with 0.2% Tween 80 and supplemented with 1% maltose, 0.05% cysteine, and 1.5% agar (MRS-maltose). Plates were incubated in a 20% CO₂ atmosphere incubator at 37 °C for 72 h. Flat, rough colonies with irregular edges and 1–2 mm diameter corresponded to *L. acidophilus*, whereas *L. paracasei* subsp. *paracasei* developed as white, smooth and circular colonies of 2–3 mm diameter (Fig. 1b). The method was also selected for the enumeration of *L. paracasei* subsp. *paracasei*. Enumeration of *B. lactis* was carried out by pour-plating appropriate dilutions into MRS fermentation broth supplemented with 1% raffinose, 0.05% LiCl, 0.05% cysteine, and 1.5% agar (MRS-raffinose). Plates were incubated in anaerobic jars at 45 °C for 72 h.

2.3. Efficiency tests

To evaluate performance of the selective methods to enumerate lactic acid bacteria (LAB) and *B. lactis*, recommendations of the ISO/TR 13843 (ISO, 2000) and ISO/IEC 17025 (ISO, 2005) standards on validation of microbiological methods were followed. Parameters evaluated were precision, accuracy, reproducibility, selectivity and specificity. The precision and accuracy of the methods were determined by the comparison between the bacterial counts obtained with selective and reference methods. Overnight pure cultures were diluted and inoculated into both selective and reference media. After logarithmic transformation of the results to normalize the distribution, counts obtained in both media were compared using paired Student's *t*-test to obtain $t_{\text{exp}} = d_m / (s_d / n^{1/2})$, where d_m is the mean of differences (d) between counts on selective and reference methods, s_d is the standard deviation of d , and n the number of samples. Other parameters calculated were relative recovery = 10^{-d_m} and relative standard deviation

of differences = $1 - 10^{-s_d}$. Reproducibility of the methods was tested by the analysis of identical samples by two different operators and using different equipments. At the same time, the matrix effect for bacterial enumeration in fermented milk was evaluated. Samples consisted of 10% reconstituted skim milk powder (Scharlab) acidified to pH 4.6 with 5 M lactic acid and inoculated with each species at both, high levels (10^7 cfu mL⁻¹) and low levels (10^5 cfu mL⁻¹). Pairs of counts were compared and the relative standard deviation of reproducibility was calculated as $1 - 10^{-s_{dr}}$, where s_{dr} is the standard deviation of differences between counts from the two operators. For selectivity and specificity analysis, cultures from all five bacterial species were mixed at the level of 10^7 cfu mL⁻¹ for each strain and appropriate dilutions inoculated into the selective media. Results were expressed as the percentage of the presumptive target counts in relation to theoretical counts. In addition, 10% reconstituted skim milk, pH 4.6, was inoculated with cultures of each target strain at low level (10^5 cfu mL⁻¹) and mixed with the other four strains at high level (10^7 cfu mL⁻¹). Appropriate dilutions were plated and analysed for the presence of presumptive false positive and negative colonies. All analyses were performed at least in triplicate and differences were compared at a significance level of 0.05 by a Student's *t*-test using Excel software (Microsoft, Redmond, WA, USA).

2.4. Analysis of fermented milk products

2.4.1. Enumeration of bacterial viable counts

The fermented milk Simbiotic Drink containing the yoghurt and probiotic strains and the product with only the yoghurt bacteria, both from Priégola, were analysed through their shelf life (28 d) for performance of the selective methods. Viable counts were determined in samples (1 mL) by using serial decimal dilutions prepared in Ringer's solution (Scharlab) supplemented with 0.05% cysteine. Appropriate dilutions were plated in duplicate and analysed using the selective methods described above.

2.4.2. Identification of presumptive target colonies

Presumptive positive colonies (10%) grown with selective methods in the highest dilution plate were checked by species-specific PCR to verify the efficacy of the media for specific enumeration. Species-specific primers were designed within variable regions in the 16S rRNA encoding genes of *S. thermophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. acidophilus* using the Lasergene PrimerSelect module of the Lasergene software package (DNASTar Inc., Madison, WI, USA). Species-specific primers for identification of *B. lactis* were designed on the basis of the transaldolase gene variable regions (Requena et al., 2002). Primer pairs (Table 1) were selected upon confirmation that only targeted species would give a PCR product. Colonies were picked up using sterile toothpicks, suspended in 20 µL milliQ water, boiled at 100 °C for 5 min and frozen at -20 °C. Diagnostic PCR

reactions were carried out with 2 µL of thawed cell suspensions and the primers described in Table 1. The amplification programme was as follows: 94 °C for 3 min, 35 cycles of 94 °C for 30 s, 60 °C for 20 s and 72 °C for 20 s, and a final extension time of 72 °C for 5 min. The products (5 µL) were separated on a 2% agarose gel and analysed for the yield of amplicons with the expected sizes (Table 1).

2.4.3. PCR-DGGE analysis

In order to obtain bacterial DNA from fermented milk, the samples (3 mL) were neutralized to pH 6.5 with 1 M NaOH and cleared by adding 10 mL of 0.2% EDTA, pH 12, to cause casein micelle dispersion. The bacterial cells were collected by centrifugation at $10,000 \times g$ for 15 min and mixed (1:1) with glass beads (diameter, 150–212 µm; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) for mechanical disruption by vortexing the ice-cooled suspensions four times over 4 min. Cell debris and glass beads were collected by centrifugation ($12,000 \times g$ for 5 min) and genomic DNA was obtained from the cell free extract as described by Meile, Rohr, Geissman, Herensperger, and Teuber (2001). The DNA was used as template (500 ng) for PCR amplification using the conditions described above. A 40-bp GC clamp (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G-3') was attached to either the forward or reverse primer (Table 1) to obtain PCR products suitable for separation by DGGE. Thus, the following species-specific primers were employed: Thermfor-GC and Thermrev for the identification of *S. thermophilus*, Bulgfor and Bulgrev-GC for *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, Acidfor-GC and Acidrev for *L. acidophilus*, Casfor-GC and Casrev for *L. paracasei* subsp. *paracasei*, and Forlac and Revlac-GC for *B. lactis*. An identification ladder containing equal amounts of PCR products from pure cultures was prepared.

DGGE was performed with a DCode system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), using a 9% polyacrylamide gel with a 40–60% gradient of 7 M urea and 40% formamide that increased in the electrophoresis running direction. Electrophoresis was carried out in 20 mM Tris, 10 mM acetic acid and 0.5 mM EDTA (0.5 × TAE) buffer at 130 V and 60 °C for 4.5 h. Gels were stained with AgNO₃ as described by Sanguinetti, Dias-Neto, and Simpson (1994).

3. Results and discussion

3.1. Comparison of bacterial counts using selective and reference methods

This study has focused on the development of selective methods suited to recover the maximum population of *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *B. lactis* in fermented milk as compared with that of supporting optimal growth (reference methods) to avoid underestimation of the bacterial counts. Therefore, formulation of the methods was based on antibiotic-free media, carbohydrate

fermentation patterns and different incubation conditions. Incubation in aerobiosis at 45 °C during 24 h in M17-lactose agar was found suitable for selective enumeration of *S. thermophilus*, since it prevented the growth of *L. paracasei* subsp. *paracasei* found at 37 °C and that of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *B. lactis* that developed under anaerobic conditions. Extension of the incubation period for 48 h allowed the appearance of pinpoint colonies of *L. acidophilus*. Therefore, these incubation conditions provided selective characteristics for *S. thermophilus* enumeration, although the medium does not inhibit the growth of the other bacteria.

The finding of a non-antibiotic medium for selective enumeration of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* could not be based on the acidified MRS medium recommended by ISO/FDIS 7889 IDF 117 standard on enumeration of yoghurt characteristic microorganisms (ISO, 2002), since it also allowed growth of *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, and *B. lactis*. Increasing the incubation at 45 °C and replacement of glucose by fructose were conditions selective against *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *B. lactis*, respectively. The method was differential against *L. acidophilus* when the medium was enriched with 0.2% Tween 80, showing a clear morphological differentiation between lenticular colonies corresponding to *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and cottony-fluffy colonies of *L. acidophilus* (Fig. 1a). The role of the compound to cause such peculiar colony morphology in *L. acidophilus* was not elucidated. Selective enumeration of *L. acidophilus* against *S. thermophilus* and *B. lactis* in fermented milk using MRS-maltose and incubation in a 20% CO₂ atmosphere was shown in a previous report (Martín-Diana, Janer, Peláez, & Requena, 2003). In the present study, the method also demonstrated to be selective against *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and differential against *L. paracasei* subsp. *paracasei*, since a clear difference in colony morphology could be assessed in the plates (Fig. 1b). Counts of *L. acidophilus* were similar when the two methods, growth in MRS-maltose and MRS-fructose, were compared (results not shown). MRS-maltose was also selected as suitable for enumeration of *L. paracasei* subsp. *paracasei* since it gave

excellent results compared with the reference method (Table 2).

MRS containing cysteine-HCl can provide optimal overall growth conditions for the non-selective enumeration of bifidobacteria (Roy, 2001; Leuschner, Bew, Simpson, Ross, & Stanton, 2003), and it was therefore selected as reference medium for *B. lactis*. Selective conditions for enumeration of this species were incubation at 45 °C, use of raffinose as a carbohydrate source and addition of 0.05% LiCl to suppress lactobacilli growth. The method was selective for *B. lactis* against the LAB strains studied. Overall characteristics of the method allowed reduction of the concentration of the antimicrobial compound LiCl to 0.05% instead of 0.2–0.3%, the amount usually added in selective media for enumeration of *Bifidobacteria* (Hartemink, Kok, Weenk, & Rombouts, 1996; Payne et al., 1999; Roy, 2001).

The Student's *t*-test was used to compare each species enumeration on both methods (reference and selective). The resulting *t* values (Table 2) were lower than the tabulated value of *t* (*t*_{tab} = 2.29) in all cases, which indicates that there were no significant differences between the two methods in bacterial enumeration at a probability level of 95%. The highest relative standard deviation of differences in counts between methods was observed for *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. In general, higher *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* counts were found at 45 °C than at 37 °C (results not shown). Optimum temperature growth at 44 °C for *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* has been previously reported (Beal, Louvet, & Corrieu, 1989), and a recommendation to increase temperature incubation for *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* slowly growing strains is included in the ISO/FDIS 7889 IDF 117 standard on yoghurt colony count technique at 37 °C (ISO, 2002). Reproducibility of the methods was tested by the analysis of identical samples, acidified milk (pH 4.6) inoculated with each species at both high level (10⁷ cfu mL⁻¹) and low level (10⁵ cfu mL⁻¹), by two different operators and using different equipment. As shown in Table 2, the relative standard deviation of reproducibility was equal or lower than 0.14 log units.

Table 2

Counts (log cfu mL⁻¹) and evaluation of performance of the selective methods to enumerate *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *B. lactis*

Parameter	<i>S. thermophilus</i>	<i>L. bulgaricus</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>B. lactis</i>
Mean ^a (log cfu mL ⁻¹) of reference method	9.02	7.74	7.35	9.39	8.75
Mean ^a (log cfu mL ⁻¹) of selective method	9.01	8.04	7.34	9.41	8.78
Relative standard deviation of differences	0.08	0.47	0.08	0.10	0.12
Student's <i>t</i> ^b	0.70	1.58	0.53	0.52	0.76
Relative recovery	0.97	2.02	0.97	1.03	1.07
Relative standard deviation of reproducibility	0.14	0.13	0.13	0.07	0.08
Selectivity (%)	101.8	103.9	100.7	101.1	97.6

^aMeans are average from three independent analyses.

^b*t*_{tab} = 2.29.

To verify the selectivity of the methods, cultures of *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *B. lactis* were mixed at approximately 10^7 cfu mL⁻¹ in the ratio of 0.2, 1, 5, 0.2, and 1, respectively, and appropriate dilutions plated into the selective media. The results, expressed as the percentage of presumptive target counts in relation to theoretical counts, are shown in Table 2. Percentages close to 100% indicate that the selective methods yielded counts that were nearly equal to the theoretical counts, which indicates that the efficacy of the methods for selective enumeration of the five species in mixed cultures could be considered acceptable. Specificity and selectivity of the methods were also analysed in acidified milk, pH 4.6, that was inoculated with cultures of each target strain at low level (10^5 cfu mL⁻¹) and the other four strains at high level (10^7 cfu mL⁻¹). There was no interference between species for the enumeration of *S. thermophilus* and *B. lactis* in the corresponding selective media, and for *L. paracasei* subsp. *paracasei* when it was incubated in aerobiosis at 30 °C for 48 h in MRS agar. However, differential enumeration of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. acidophilus* in MRS-fructose (Fig. 1a) and of *L. acidophilus* and *L. paracasei* subsp. *paracasei* in MRS-maltose (Fig. 1b) could only be made when differences of counts between the two species were lower than 2 log units (results not shown).

3.2. Enumeration of bacteria in fermented milk products using the selective methods

The performance of the methods for selective enumeration of yoghurt and probiotic bacteria was carried out in the commercial probiotic product Simbiotic Drink (Priégola), containing *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *B. lactis* as stated in the label, and the product manufactured with only the yoghurt bacteria. Results in Table 3 are averages from eight batches of each product analysed over 4 weeks. The results obtained indicated that there was low

variation between production batches, reliable counts for the probiotic and yoghurt strains and acceptable viability of the species throughout the shelf life of the products. The selective methods were therefore suitable for enumeration of the species, mostly because they were evaluated for the specific microorganisms present in the product. The results strengthen the rising opinion that selective or differential media should be evaluated for the specific strains of species of interest in each particular product (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001). As stated by Talwalkar and Kailasapathy (2004), the search for a single media in the literature that would provide reliable cell counts of *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., and *L. casei* in several different products could be unsuccessful.

Developed colonies (10%) from each selective media were subjected to confirmation test by species-specific PCR identification using primers based on the 16S rRNA gene sequence obtained from the LAB strains and on the partial sequence of the transaldolase gene sequence from *B. lactis* previously described (Requena et al., 2002). Specificity of the primers and PCR conditions to identify the analysed species were tested with DNA from pure cultures. Formation of specific amplicons was exclusively observed from the corresponding species (results not shown). All the presumptive target colonies analysed from selective and differential plates confirmed their identity by yielding PCR products of the expected sizes (Fig. 2). In addition, the species-specific primer pairs designed and the PCR conditions developed in this study proved to be a very rapid and effective method for the identification of the species.

3.3. Identification by PCR–DGGE of species present in the fermented milk

The primers used for species-specific PCR identification of colonies were also suitable for identification of *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *B. lactis* in culture-independent analysis of the fermented milk Simbiotic Drink using PCR–DGGE. The efficiency of separation was assayed by comparing amplicons obtained from pure cultures with the GC clamp attached to the forward or the reverse primer (see Material and methods). The appropriate products were combined to obtain the reference ladder that allowed for the identification of species in the fermented milk without prior isolation (Fig. 3). In spite of the length homogeneity of amplicons (Table 1 and Fig. 2), the technique allowed a distinguishable separation of fragments, showing a great detection and identification potential for analysis of these products. The efficiency of PCR–DGGE for lactobacilli and bifidobacteria identification of commercial probiotic products has been recently demonstrated (Fasoli et al., 2003; Temmerman, Scheirlinck, Huys, & Swings, 2003). In the present work, the high annealing temperature (60 °C) of the species-specific PCR applicable to the five species would have the additional advantage of carrying out one-step species identification by

Table 3

Viable counts of *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *B. lactis* in probiotic fermented milk and yoghurt through storage at 4 °C during four weeks

Species	Counts (cfu mL ⁻¹) in fermented milk stored at 4 °C			
	1 wk	2 wk	3 wk	4 wk
Probiotic fermented milk				
<i>S. thermophilus</i>	9.32 (0.09)	9.15 (0.18)	9.22 (0.14)	9.14 (0.37)
<i>L. bulgaricus</i>	7.58 (0.28)	7.36 (0.53)	7.63 (0.07)	6.05 (1.03)
<i>L. acidophilus</i>	7.12 (0.30)	7.11 (0.33)	6.81 (0.33)	6.44 (0.36)
<i>L. paracasei</i>	6.49 (0.12)	6.48 (0.27)	6.49 (0.13)	6.47 (0.21)
<i>B. lactis</i>	8.08 (0.13)	8.03 (0.22)	7.97 (0.22)	8.15 (0.15)
Yoghurt				
<i>S. thermophilus</i>	8.88 (0.12)	8.91 (0.46)	8.98 (0.22)	8.94 (0.05)
<i>L. bulgaricus</i>	8.26 (0.11)	8.35 (0.13)	8.23 (0.13)	8.21 (0.07)

^aMeans are average from eight batches. Standard deviation in parenthesis.

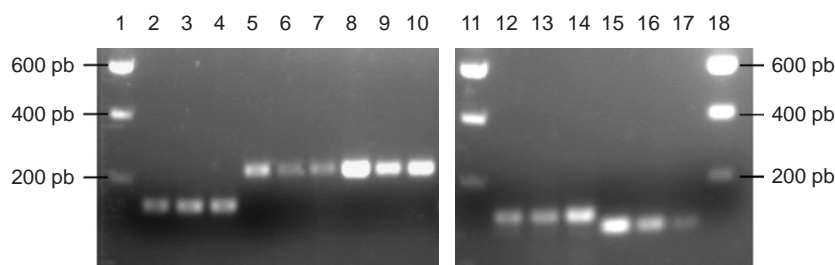


Fig. 2. Polymerase chain reaction products obtained from pure culture DNA and two colonies enumerated as *S. thermophilus* (lanes 2, 3 and 4), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (lanes 5, 6 and 7), *L. acidophilus* (lanes 8, 9 and 10), *L. paracasei* subsp. *paracasei* (lanes 12, 13 and 14) and *B. lactis* (lanes 15, 16 and 17).

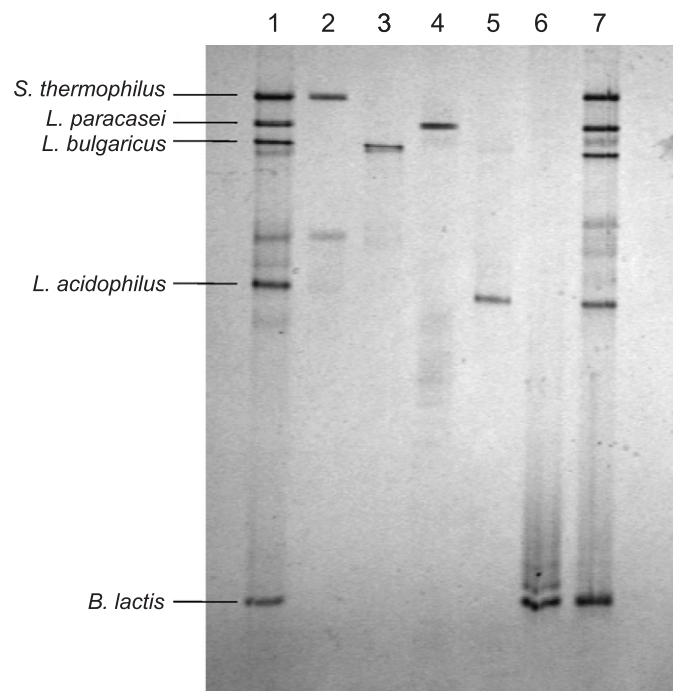


Fig. 3. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of the polymerase chain reaction products obtained from probiotic fermented milk using the species-specific primers for *S. thermophilus* (lane 2), *L. paracasei* subsp. *paracasei* (lane 3), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (lane 4), *L. acidophilus* (lane 5) and *B. lactis* (lanes 6). Lanes 1 and 7: DGGE identification ladder.

multiplex PCR combined with separation of fragments by DGGE, a study that is currently underway.

4. Conclusions

The present study shows that the combined use of selective plating media and different incubation conditions provide an effective antibiotic-free approach to the selective enumeration of *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *B. lactis* in mixed cultures present in fermented milk products. The choice of methods was based on carbohydrate fermentation patterns and incubation at different temperatures and atmospheric conditions that were targeted to the species present in the product. Efficiency of the selective methods was verified by

evaluation of performance using statistical parameters such as precision, accuracy, reproducibility, selectivity and specificity, and by identification of the enumerated species by species-specific PCR. As a complementary advantage, this study also demonstrates that the combination of species-specific PCR and DGGE analysis shows a great detection and identification potential for verification of accurate species-labelling in fermented milk without previous isolation of the bacteria.

Acknowledgements

This work was financed by the Spanish Research Projects AGL2004-07285-C02-01 and ALIBIRD (S-0505/AGR-0153). We thank D. Salvador for technical assistance and Priégola for the supply of fermented milk samples.

References

- Beal, C., Louvet, P., & Corrieu, G. (1989). Influence of controlled pH and temperature on the growth and acidification of pure cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32, 148–154.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., & Collins, J. K. (1997). Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *International Journal of Food Microbiology*, 35, 1–27.
- CODEX Alimentarius Commission. (2003). CODEX standard for fermented milks. Codex Stan 243-2003. Retrieved September 1, 2006, from <http://www.codexalimentarius.net/download/standards/400/CXS_243e.pdf>.
- Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., Gueguen, M., & Vernoux, J. P. (2003). Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Le Lait*, 83, 269–306.
- Dellaglio, F., & Felis, G. E. (2005). Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. In G. W. Tannock (Ed.), *Probiotics and prebiotics: Scientific aspects* (pp. 25–49). Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- De Man, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130–135.
- Ercolini, D. (2004). PCR–DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 297–314.
- FAO/WHO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Retrieved August 23, 2006, from <<ftp://ftp.fao.org/esn/food/wgreport2.pdf>>.
- Fasoli, S., Marzotto, M., Rizzotti, L., Rossi, F., Dellaglio, F., & Torriani, S. (2003). Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR–DGGE analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 59–70.

- Gueimonde, M., Delgado, S., Mayo, B., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., & De los Reyes-Gavilán, C. G. (2004). Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. *Food Research International*, 37, 839–850.
- Hartemink, R., Kok, B. J., Weenk, G. H., & Rombouts, F. M. (1996). Raffinose–Bifidobacterium (RB) agar, a new selective medium for bifidobacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 27, 33–43.
- ISO. (2000). *Water quality—Guidance on validation of microbiological methods. ISO/TR 13843:2000*. Geneva, Switzerland: International Organisation for Standardization.
- ISO. (2002). *Yogurt—Enumeration of characteristics microorganisms—Colony count technique at 37°C. ISO/FDIS 7889 IDF 117*. Geneva, Switzerland: International Organisation for Standardization.
- ISO. (2005). *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ISO/IEC 17025:2005*. Geneva, Switzerland: International Organisation for Standardization.
- Leuschner, R. G. K., Bew, J., Simpson, P., Ross, P. R., & Stanton, C. (2003). A collaborative study of method for the enumeration of probiotic bifidobacteria in animal feed. *International Journal of Food Microbiology*, 83, 161–170.
- Lourens-Hattingh, A., & Viljoen, B. C. (2001). Yoghurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, 11, 1–17.
- Martín-Diana, A. B., Janer, C., Peláez, C., & Requena, T. (2003). Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 13, 827–833.
- Masco, L., Huys, G., De Brandt, E., Temmerman, R., & Swings, J. (2005). Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 221–230.
- Meile, L., Rohr, L. M., Geissman, T. A., Herensperger, M., & Teuber, M. (2001). Characterization of the D-xylulose 5-phosphate/D-Fructose 6-phosphate phosphoketolase gene (xfp) from *Bifidobacterium lactis*. *Journal of Bacteriology*, 183, 2929–2936.
- Payne, J. F., Morris, A. E. J., & Beers, P. (1999). Evaluation of selective media for the enumeration of *Bifidobacterium* sp. in milk. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 353–358.
- Requena, T., Burton, J., Matsuki, T., Munro, K., Simon, M. A., Tanaka, R., et al. (2002). Identification, detection, and enumeration of human *Bifidobacterium* species by PCR targeting the transaldolase gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2420–2427.
- Rodtong, S., & Tannock, G. W. (1993). Differentiation of *Lactobacillus* strains by ribotyping. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3480–3484.
- Roy, D. (2001). Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 69, 167–182.
- Roy, D. (2005). Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. *Le Lait*, 85, 39–56.
- Sanguinetti, C. J., Dias-Neto, E., & Simpson, A. J. G. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechniques*, 17, 914–921.
- Sartory, D. P. (2005). Validation, verification and comparison: Adopting new methods in water microbiology. *Water SA*, 31, 393–396.
- Shah, N. P. (2000). Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 83, 894–907.
- Talwalkar, A., & Kailasapathy, K. (2004). Comparison of selective and differential media for the accurate enumeration of strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus casei* complex from commercial yoghurts. *International Dairy Journal*, 14, 143–149.
- Temmerman, R., Scheirlinck, I., Huys, G., & Swings, J. (2003). Culture-independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 220–226.
- Van de Castele, S., Vanheuverzwijn, T., Ruysen, T., Van Assche, P., Swings, J., & Huys, G. (2006). Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of *lactobacilli* and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters. *International Dairy Journal*, 16, 1470–1476.
- Yeung, P. S. M., Sanders, M. E., Kitts, C. L., Cano, R., & Tong, P. S. (2002). Species-specific identification of commercial probiotic strains. *Journal of Dairy Science*, 85, 1039–1051.

IV. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE BACTERIAS LÁCTICAS Y BIFIDOBACTERIAS VIABLES EN LECHE FERMENTADA MEDIANTE EL EMPLEO DE MONOAZIDA DE PROPIDIO Y PCR A TIEMPO REAL

Artículo publicado en *International Dairy Journal*



Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milk by using propidium monoazide and real-time PCR

Tomás García-Cayuela, Raquel Tabasco, Carmen Peláez, Teresa Requena*

Department of Dairy Science and Technology, Instituto del Frío (CSIC), José Antonio Novais10, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 November 2008

Received in revised form

25 January 2009

Accepted 6 February 2009

ABSTRACT

This study describes a procedure that allows specific detection and enumeration of viable bacteria in four species of lactic acid bacteria (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* and *Lactobacillus acidophilus*) and of *Bifidobacterium lactis*, mixed in fermented milk products. The procedure is based on the combined use of propidium monoazide (PMA), able to distinguish between viable and irreversibly damaged cells, with species-specific quantitative real-time PCR (RTi-PCR). Loss of viability of the species in a fermented milk through storage at 4 °C was similarly ($P < 0.05$) detected by PMA-RTi-PCR and selective plate counts. Furthermore, comparison of results obtained by both methods showed a Pearson linear correlation of 0.995. The enumeration of viable bacteria by PMA-RTi-PCR could be performed in 3 h, whereas enumeration by selective plate counts required three days. The procedure developed is a fast method for the identification, enumeration and discrimination of viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria mixed in fermented milk products.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Yoghurt starters are often combined with other lactic acid bacteria or bifidobacteria to produce fermented milk with specific characteristics in terms of flavour or health properties. According to the CODEX standard for fermented milk (CODEX STAN 243-2003) the bacteria found in these products should be viable, active and abundant in the product to the date of minimum durability. In addition to the specific starter cultures used for fermentation, the counts of microorganisms in the fermented milk should be at least 10^6 cfu g⁻¹ (CODEX Alimentarius Commission, 2003).

The presence of multiple and closely related species in these products makes the differential enumeration of probiotic and yoghurt starter bacteria difficult due to similarity in growth requirements and overlapping biochemical profiles of the species. Plating on media is one of the classic techniques for determining the viability of probiotics but these techniques suffer from several drawbacks such as a lack of selectivity, or use of antibiotics, limiting microbial recovery and sensitivity. It is particularly important in mixtures of bacteria that have lost culturability but still retain measurable metabolic activity (Mukamolova et al., 2003). Lahtinen et al. (2005) showed the presence of bacteria of the genus

Bifidobacterium in a dormant (inactive but ultimately culturable) state in stored probiotic foods.

The use of molecular techniques has largely resolved the problem of lack of sensitivity and specificity of plating on selective media, and now real-time PCR (RTi-PCR) is the most widely applied technique for direct quantification of bacteria in mixed samples (Justé et al., 2008). However, its main drawback is the inability to discriminate between live and dead bacteria because the DNA can be amplifiable although the cells are dead (Josephson et al., 1993; Justé et al., 2008; Nocker et al., 2006). Recently, the use of DNA intercalating agents that inhibit its amplification has revolutionized molecular techniques of RTi-PCR to permit a quantitative and differential detection of viable versus non-viable bacteria.

The main criterion to distinguish between viable cells and irreversibly damaged cells is the integrity of the membrane. The viable cells with intact membranes are impermeable to the passage of certain intercalating DNA agents, which however, easily penetrate cells with damaged membranes. Ethidium monoazide (EMA) and propidium monoazide (PMA) have been shown to be useful for distinction of some live/dead Gram-positive and Gram-negative bacteria (Nocker and Camper, 2006; Nogva et al., 2003; Nocker et al., 2006, 2007a,b; Rudi et al., 2005a,b). However, Flekna et al. (2007) and Nocker et al. (2006) have demonstrated that EMA is a poor indicator of cell viability. In addition, Pan and Breidt (2007) showed that EMA, but not PMA, was toxic to viable cells. Therefore, the presence of culturable bacteria and bacteria that have an intact

* Corresponding author. Tel.: +34 915492300; fax: +34 915493627.

E-mail address: trequena@if.csic.es (T. Requena).

and functional cell membrane, typical of viable cells, but do not form colonies on conventional growth media, could be detected using PMA with RTi-PCR.

The aim of this study was to develop a procedure that allows unequivocal and simultaneous detection and quantification of viable bacteria in four species of lactic acid bacteria (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus acidophilus*) and *Bifidobacterium lactis*, mixed in fermented milk. The procedure was based on the combined use of the DNA intercalating agent PMA, with the speed and sensitivity of quantitative RTi-PCR using species-specific primers previously designed from the 16S rRNA gene for the lactic acid bacteria species and the transaldolase gene for *B. lactis* (Tabasco et al., 2007). To evaluate the performance of the RTi-PCR for specific enumeration, the results were compared with those obtained using the selective plating method based on antibiotic-free media developed previously for these species (Tabasco et al., 2007).

2. Materials and methods

2.1. Microorganisms and culture conditions

The strains used in this assay were *S. thermophilus* STY-31, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBY-27, *Lb. acidophilus* LA-5, *Lb. casei* subsp. *casei* LC-01 and *B. lactis* BB-12. The strains were isolated from a synbiotic commercial product (Simbiotic Drink, Priégola, Madrid, Spain) as described by Tabasco et al. (2007). *S. thermophilus* was grown in M17 broth (Pronadisa, Madrid, Spain) containing 2% lactose. *Lactobacillus* spp. and *B. lactis* were grown under anaerobic conditions (Gas-Pack, Anaerogen; Oxoid Ltd., Hampshire, England) in MRS broth (Pronadisa) supplemented with 0.05% L-cysteine hydrochloride, except for *Lb. casei* subsp. *casei* that was grown aerobically in MRS broth. Incubations were carried out for 18–24 h at 37 °C with the exception that 30 °C was used for *Lb. casei* subsp. *casei*. The strains were also grown in 10% reconstituted skim milk supplemented with 0.8% casein acid hydrolysate (Sharlau, Barcelona, Spain) to obtain cells for creating standard curves for each strain (see Section 2.2.3.)

2.2. Viability assays

Viability assays were performed for cultures of the pure strains and the commercially fermented milk Simbiotic Drink containing the yoghurt (*S. thermophilus* STY-31, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBY-27) and probiotic (*Lb. acidophilus* LA-5, *Lb. casei* subsp. *casei* LC-01, *B. lactis* BB-12) strains. The viability analyses of the strains in the commercial fermented milk stored at 4 °C was assessed through the product shelf life (28 d) and 30 and 60 d after the expiry date. The colony forming units (cfu) of cultures were assessed by the plate count method using the selective antibiotic-free media developed previously for these species (Tabasco et al., 2007). The incubation conditions used for the selective plating methods are summarized in Table 1. The enumeration of viable cells by RTi-PCR was based on treatment of the bacteria with PMA, followed by isolation of total DNA and quantitative PCR.

2.2.1. PMA treatment

The cultures of pure strains grown in milk and the commercial fermented milk containing the mixed species (3 mL) were adjusted to pH 6.5 with 1 M NaOH and then casein micelles were dispersed by addition of 1 M trisodium citrate. Cells were harvested by centrifugation (10,000 × g, 10 min), washed with 1.5% NaCl and resuspended in 500 µL MilliQ autoclaved water. Cell suspensions were treated with PMA as described by Nocker et al. (2006) but

with slight modifications. PMA (phenanthridium, 3-amino-8-azido-5-[3-(diethylmethylammonio) propyl]-6-phenyl dichloride; Biotium, Inc., Hayward, CA, USA) was dissolved in 20% dimethyl sulfoxide (DMSO) to obtain a stock concentration of 20 mM and stored at –20 °C in the dark. The PMA solution (1.25 µL) was added to 500 µL culture aliquots to give a final concentration of 50 µM.

Following an incubation period of 5 min in the dark with occasional mixing to allow the PMA to penetrate the dead cells and to bind to the DNA, samples were exposed for 15 min to a 500 W halogen light source. The samples were placed on ice (to prevent heating) and placed about 20 cm from the light source. After photo-induced cross-linking, cells were pelleted at 10,000 × g for 10 min, washed with 1.5% NaCl and MilliQ water in order to remove the inactivated PMA and resuspended in MilliQ autoclaved water prior to DNA isolation.

2.2.2. DNA isolation

Total genomic DNA from samples was extracted by the QIAamp® DNA kit (QIAGEN, Hilden, Germany). To improve the extraction, cells were treated by bead beating using glass beads (1:1) and a FastPrep machine (Bio 101; Savant Instruments, Holbrook, NY, USA) for 45 s at a speed setting of 5.5 ms⁻¹. Glass beads and cell debris were removed by centrifugation at 21,000 × g for 10 min. Purification of DNA was obtained according to the manufacturer's instructions.

2.2.3. Creation of standard curves

The standard curves used to make correlations between viable counts determined by RTi-PCR coupled with PMA and plate counts using the selective agar media were obtained from mixtures containing defined ratios of viable and heat-treated cells of each species. The cells from pure cultures were grown in skim milk and obtained as described above. Non-viable cells were obtained by heating cell suspensions at 121 °C for 15 min, resulting in a decrease in culturable cell counts to zero. For each species, 10-fold serial dilutions of untreated cells were made in the corresponding heat-killed cell suspension (total volume of 500 µL) to give standard curves for *S. thermophilus* and *Lb. casei* subsp. *casei* of 10⁹, 10⁸, 10⁷ and 10⁶ cfu mL⁻¹ viable cells, and for *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. acidophilus* and *B. lactis* the standard curves were of 10⁸, 10⁷, 10⁶ and 10⁵ cfu mL⁻¹ viable cells. PMA treatment of cell suspensions and DNA isolation were carried out in the same way as for cells obtained from the commercial fermented milk.

2.3. Real-time PCR

The species-specific primers used in this study were previously designed (Tabasco et al., 2007) and are based on the 16S rRNA gene for lactic acid bacteria species and the transaldolase gene for *B. lactis*. The efficiency of the selected primers for quantifying bacterial DNA by RTi-PCR obtained in each amplification cycle, was checked by developing curves with serially diluted 10-fold DNA obtained from pure cultures grown in skim milk.

The quantification by RTi-PCR was performed with the iQ™5 Multicolor Real-Time PCR detection system Cyclar (BIO-RAD,

Table 1
Characteristics of selective methods used for plate counts.

Species	Growth medium ^a	Temperature/time	Atmospheric conditions
<i>S. thermophilus</i>	M17-Lactose	45 °C/24 h	Aerobiosis
<i>Lb. bulgaricus</i>	MRS-Fructose	45 °C/72 h	Anaerobiosis
<i>Lb. acidophilus</i>	MRS-Maltose	37 °C/72 h	CO ₂ atmosphere
<i>Lb. casei</i>	MRS-Glucose	30 °C/48 h	Aerobiosis
<i>B. lactis</i>	MRS-Raffinose	45 °C/72 h	Anaerobiosis

^a Media described by Tabasco et al. (2007).

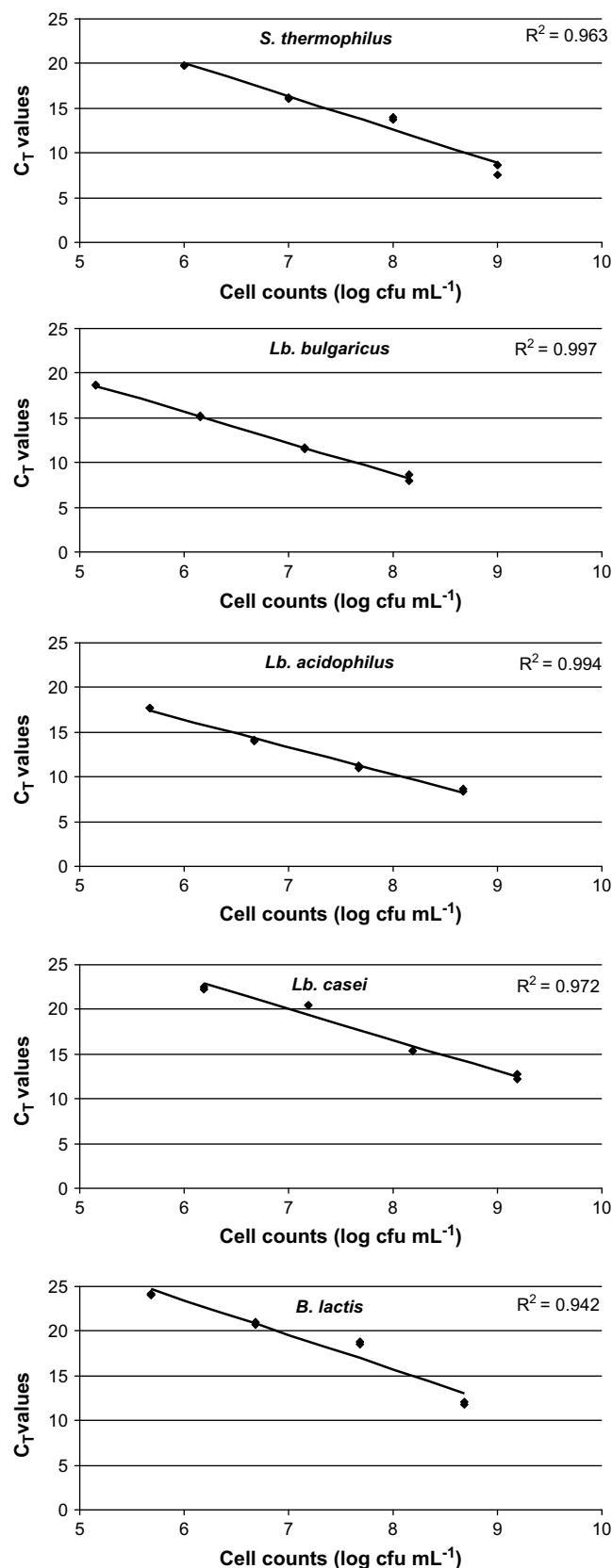


Fig. 1. Standard curves for quantifying viable *S. thermophilus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* and *B. lactis* in viable cell–dead cell mixtures by real-time PCR (RTi-PCR) combined with propidium monoazide (PMA). The linear regression coefficient factor (R^2) for each species is placed alongside the graphs.

Hercules, CA, USA). The 25 μ L reaction mixture contained 12.5 μ L of IQ SYBR Green Supermix (BIO-RAD), 0.5 μ L of each primer (20 μ M) and 2 μ L of template DNA. RTi-PCR was performed with initial denaturation at 95 $^{\circ}$ C for 3 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 $^{\circ}$ C for 10 s, and primer annealing and extension at 60 $^{\circ}$ C for 30 s. C_T values were obtained from the annealing and extension step in each cycle. At the end of each PCR run, melting curve analysis was performed from 60 to 95 $^{\circ}$ C (0.5 $^{\circ}$ C s $^{-1}$) for detecting non-specific PCR product and primer-dimer co-amplification.

2.4. Data analysis

The C_T values obtained by RTi-PCR were automatically generated by the iQTM5 software. The C_T values were used to quantify the viable cells (cfu mL $^{-1}$) in the fermented milk samples by extrapolation from the standard curve obtained for each species with known amounts of viable cells. The slope (s) of the standard curve was used for calculation of the RTi-PCR efficiency (E) using the following equation (Klein et al., 1999):

$$E = 10^{(-1/s)} - 1$$

Data analysis was done using Microsoft Excel for Windows (Microsoft, Redmond, WA, USA). Student's t -test was used to determine statistically significant differences between the counts derived from Real-Time PCR with PMA (PMA-RTi-PCR) assays and plate counts. All analyses were performed at least in duplicate and differences were compared at a significance level of 0.05. Furthermore, Pearson test served for checking the correlation between the results obtained by both methods.

3. Results and discussion

3.1. Applicability of the species-specific primers for real-time PCR and standard curves for cell viability quantification

The specificity of the primer pairs used in this study for the quantification of *S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* subsp. *casei*, and *B. lactis* was tested in a previous study by Tabasco et al. (2007). The assays had been positive for the corresponding target species and no cross-reactions were observed with any of the non-target microorganisms. The efficiency of amplification for the species-specific primers in the individual RTi-PCR assays was calculated from curves obtained by plotting the C_T values against the 10-fold dilution series of target DNA from known amounts of bacteria. The generated curves showed good correlation coefficient values that ranged between 0.990 and 0.998, indicating that results were linear over the range of bacteria concentrations tested (10 5 –10 9 cfu mL $^{-1}$). The efficiency of the reactions resulted in values ranging from 0.90 and 0.99. The values obtained fall into the efficiency range of the quantitative RTi-PCR that should be >0.90 in order to obtain accurate and reproducible results. Ideally, PCR efficiencies should be as close to 1 as possible, since a value of 1 indicates a two-fold increase of amplicon at each cycle (Peirson et al., 2003). The analysis of the melting curves obtained for each reaction did not reveal the formation of either non-specific fragment or primer-dimers that could interfere during the fluorescence reading, especially when using SYBR Green as the issuer of fluorescence because all double chain DNA is detected.

The PMA-RTi-PCR analysis of DNA of the five species from known amounts of viable cells in mixtures with heat-killed cells generated standard curves with R^2 between 0.942 and 0.997 (Fig. 1). These values are of relevance for viability quantification by RTi-PCR since the standard curves were created by diluting viable

Table 2

Viable counts^a of *S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* subsp. *casei* and *B. lactis* in fermented milk through storage at 4 °C. The fermented milk was analyzed by real-time PCR (RTi-PCR) combined with propidium monoazide (PMA) and plate counts within shelf life (28 days), and at 30 days and 60 days after expiry date.

Species	Shelf life (28 days at 4 °C)		30 days after expiry date (4 °C)		60 days after expiry date (4 °C)	
	RTi-PCR	Plate	RTi-PCR	Plate	RTi-PCR	Plate
<i>S. thermophilus</i>	9.53 ± 0.06	9.27 ± 0.02	9.29 ± 0.01	9.00 ± 0.01	9.37 ± 0.04	9.26 ± 0.04
<i>Lb. bulgaricus</i>	7.44 ± 0.12	7.64 ± 0.11	6.10 ± 0.02	6.03 ± 0.04	4.89 ± 0.01	4.39 ± 0.01
<i>Lb. acidophilus</i>	6.60 ± 0.06	6.65 ± 0.11	3.64 ± 0.13	3.61 ± 0.08	<3	<3
<i>Lb. casei</i>	7.57 ± 0.13	6.79 ± 0.10	6.81 ± 0.00	6.81 ± 0.07	6.86 ± 0.00	6.89 ± 0.01
<i>B. lactis</i>	8.22 ± 0.05	8.20 ± 0.05	7.86 ± 0.03	7.94 ± 0.02	7.91 ± 0.06	8.00 ± 0.03

^a Values are means ± SD of duplicate determinations on three independent fermented milk batches and expressed as log cfu mL⁻¹ for plate counts and log cfu equivalents mL⁻¹ for RTi-PCR.

bacteria in a background of heat-killed bacteria, in contrast to standard curves obtained from decimal dilutions of DNA from a known amount of viable cells. Pan and Breidt (2007) also developed standard curves for quantifying *Listeria monocytogenes* by RTi-PCR using mixtures of viable and non-viable cells treated with PMA, which showed standard curves with an R^2 value of 0.982, similar to those obtained in this study.

The estimated cfu mL⁻¹ by PMA-RTi-PCR from mixtures only containing heat-killed bacteria was used to establish the quantification limit for each species. The quantification limit was 1×10^3 cfu mL⁻¹ for *Lb. bulgaricus*, *Lb. acidophilus* and *B. lactis*, and 1×10^4 cfu mL⁻¹ for *S. thermophilus* and *Lb. casei*. These values are similar to the results of the Real-Time PCR with EMA (EMA-RTi-PCR) analysis of *Campylobacter jejuni* reported by Rudi et al. (2005b) and the PMA-RTi-PCR assays of *L. monocytogenes* described by Pan and Breidt (2007). Our quantification limits provide sufficient sensitivity of detection for the majority of commercial fermented milk products, since counts of these bacteria should be higher in the products to meet the Codex standard (CODEX Alimentarius Commission, 2003).

3.2. Quantification of viable bacteria from fermented milk derived from real-time PCR, with PMA treatment, and its comparison with plate counts

The performance of PMA-RTi-PCR for enumeration of yoghurt and probiotic viable bacteria was carried out in the commercial probiotic product Simbiotic Drink (Priégola), containing *S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* subsp. *casei* and *B. lactis*, and compared with plate counts obtained using selective media (Tabasco et al., 2007). The quantification of viable bacteria was performed on the product during various stages of storage at 4 °C, namely during the product's commercial life (28 d) and one month and two months after the expiration date (Table 2). The estimated log of cfu mL⁻¹ was obtained from C_T values derived from RTi-PCR assays, with PMA treatment of cells and utilizing the standard curves previously described, and from plate counts. The results showed that the viability of the studied species in the fermented milk product was only affected after the expiration date. This loss of viability was similarly ($P < 0.05$) detected by both methods. Furthermore, comparison of results obtained by PMA-RTi-PCR and plate counts showed a Pearson linear correlation of 0.995. The results obtained by PMA-RTi-PCR for *Lb. casei* subsp. *casei* in the product during the shelf life appear to overestimate the viable counts with respect to the plate counts, although both results were equivalent ($P < 0.05$) in the expired product (Table 2). Likewise, Auty et al. (2001) described that a high degree of clumping exhibited by *Lb. casei* resulted in underestimation of the species counts by one log unit when compared with viability assessed by confocal scanning laser microscopy direct cell enumeration.

The viability counts found in the product by the two methods were high for *S. thermophilus*, *Lb. casei* subsp. *casei* and *B. lactis* even two months after the expiry date. On the other hand, the counts of *Lb. acidophilus* and *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* decreased sharply during storage (Table 2). Low viability of *Lb. acidophilus* LA-5 during fermented milk storage has been described in previous studies (Martín-Diana et al., 2003; Nighswonger et al., 1996; Tabasco et al., 2007). The high correlation of both methods to enumerate viable bacteria can be explained by the fact that PMA penetrates only cells that have undergone lethal membrane damage (Nocker et al., 2006). Therefore, treatment of samples with PMA constitutes a powerful method for distinguishing between viable and dead bacterial cells by RTi-PCR and the procedure can be used in fermented milk products instead of the plate count method. The procedure also greatly shortened the enumeration time from a minimum of 3 days for plate counts to about 3 h by PMA-RTi-PCR.

4. Conclusions

To our knowledge, this is the first published study reporting the application of PMA and RTi-PCR for the quantification in fermented milk of viable probiotic strains belonging to the species *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* and *B. lactis* in mixed cultures with yoghurt starter species. The main advantages of the procedure developed are that it allows an easy, simple and precise quantification of viable bacteria within a detection range of 5 log units. Furthermore, the use of species-specific primers in the assay allows the identification and enumeration of the viable bacteria in complex mixtures present in fermented milk products. The time needed to yield results with PMA and RTi-PCR can be performed in about 3 h compared with 72 h required with plate count methods.

Acknowledgements

This work was funded by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (grants: AGL2004-07285-C02-01, AGL2006-12100 and Consolider FUN-C-FOD CSD2007-063) and Comunidad Autónoma de Madrid (ALIBIRD: S-0505/AGR-0153). We thank Priégola for the supply of fermented milk samples.

References

- Auty, M.A., Gardiner, G.E., McBrearty, S.J., O'Sullivan, E.O., Mulvihill, D.M., Collins, J.K., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., Ross, R.P., 2001. Direct in situ viability assessment of bacteria in probiotic dairy products using viability staining in conjunctions with confocal scanning laser microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 420–425.
- CODEX Alimentarius Commission, 2003. CODEX standard for fermented milks. Codex Stan 243-2003. http://www.codexalimentarius.net/download/standards/400/CXS_243e.pdf (accessed 05.11.08.).
- Flekna, G., Stefanic, P., Wagner, M., Smulders, F.J., Mozina, S.S., Hein, I., 2007. Insufficient differentiation of live and dead *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes* cells by ethidium monoazide (EMA) compromises EMA/real-time PCR. *Research in Microbiology* 158, 405–412.

- Josephson, K.L., Yerba, C.Q., Pepper, I.L., 1993. Polymerase chain-reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 3513–3515.
- Justé, A., Thomma, B.P., Lievens, B., 2008. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology* 25, 745–761.
- Klein, D., Janda, P., Steinborn, R., Müller, M., Salmons, B., Günzburg, W.H., 1999. Proviral load determination of different feline immunodeficiency virus isolates using real-time polymerase chain reaction: influence of mismatches on quantification. *Electrophoresis* 20, 291–299.
- Lahtinen, S.J., Gueimonde, M., Ouwehand, A.C., Reinikainen, J.P., Salminen, S.J., 2005. Probiotic bacteria may become dormant during storage. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1662–1663.
- Martín-Diana, A.B., Janer, C., Peláez, C., Requena, T., 2003. Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal* 13, 827–833.
- Mukamolova, G.V., Kaprelyants, A.S., Kell, D.B., Young, M., 2003. Adoption of the transiently non-culturable state – a bacterial survival strategy? *Advances in Microbial Physiology* 47, 65–129.
- Nighswonger, B.D., Brashears, M.M., Gilliland, S.E., 1996. Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in fermented milk products during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science* 79, 212–219.
- Nocker, A., Camper, A.K., 2006. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1997–2004.
- Nocker, A., Cheung, C.Y., Camper, A.K., 2006. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of Microbiological Methods* 67, 310–320.
- Nocker, A., Sossa, K.E., Camper, A.K., 2007a. Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *Journal of Microbiological Methods* 70, 252–260.
- Nocker, A., Sossa-Fernandez, P., Burr, M.D., Camper, A.K., 2007b. Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5111–5117.
- Nogva, H.K., Dromtorp, S.M., Nissen, H., Rudi, K., 2003. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *Biotechniques* 34, 804–813.
- Pan, Y., Breidt, F., 2007. Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 8028–8031.
- Peirson, S.N., Butler, J.N., Foster, R.G., 2003. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Research* 31 (14), e73.
- Rudi, K., Moen, B., Dromtorp, S.M., Holck, A.L., 2005a. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1018–1024.
- Rudi, K., Naterstad, K., Dromtorp, S.M., Holo, H., 2005b. Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* on gouda-like cheeses by real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology* 40, 301–306.
- Tabasco, R., Paarup, T., Janer, C., Peláez, C., Requena, T., 2007. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. *International Dairy Journal* 17, 1107–1114.

V. INHIBICIÓN DE UROPATÓGENOS POR BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DE PRODUCTOS LÁCTEOS E INTESTINOS ANIMALES DEL OESTE DE NIGERIA

Artículo publicado en *Archives in Microbiology*

Inhibition of uropathogens by lactic acid bacteria isolated from dairy foods and cow's intestine in western Nigeria

Funmilola A. Ayeni · Bolanle A. Adeniyi ·
Samuel T. Ogunbanwo · Raquel Tabasco ·
Torsten Paarup · Carmen Peláez · Teresa Requena

Received: 17 April 2009 / Revised: 17 April 2009 / Accepted: 28 May 2009 / Published online: 16 June 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract A total of 96 lactic acid bacteria (LAB) were isolated from African indigenous fermented products and cow's intestines to study their inhibitory capability against multi-drug-resistant uropathogens. *Escherichia coli* accounted for approximately 45% of isolated uropathogens, followed by *Staphylococcus* spp. (20%). The Gram negative uropathogens were highly resistant to quinolones, co-trimoxazole, teicoplanin and some β -lactams, while the *Staphylococcus* spp. showed high resistance to aminoglycosides, β -lactams and macrolides. Twenty-four LAB isolates were selected based on their antimicrobial activity against two uropathogenic *Staphylococcus aureus* strains and bacteriocin production. LAB strains showing antimicrobial activity were grouped into smaller groups through amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). Representative strains were identified as *Weissella* spp., *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus*

brevis through sequencing of 16S rDNA. The *Weissella* spp. and *L. brevis* strains demonstrated remarkable inhibitory activity against seven strains of Gram negative uropathogens. Two strains of *L. lactis* produced a bacteriocin-like inhibitory substance active against *Lactobacillus sakei*. In this study, an unusual high rate of co-trimoxazole, quinolones and macrolides resistance among uropathogens from south west Nigeria was discovered. Based on their sensitivity to *Weissella* spp., there is a potential for using these LAB as a natural approach for the protection against the uropathogens assayed.

Keywords Lactic acid bacteria · Antimicrobials · Uropathogens · Antibiotic resistance

Introduction

Urinary tract infection (UTI) remains a worldwide therapeutic problem, not only causing nosocomial disease but also community acquired infections (Gupta et al. 2001). UTI is one of the most frequently diagnosed infections affecting people of all ages and it is associated with high rate of morbidity and mortality. Bacterial isolates from UTI cases are usually characterized by steady increase in their level of resistance to commonly used antibiotics, including ampicillin, trimethoprim-sulphamethoxazole (TMP-SMX) or co-trimoxazole and the quinolones, with most uropathogens being multi-drug resistant (Garau et al. 1999). Surveillance studies on antimicrobial resistance in different regions of the world are necessary because the UTI pathogens have been confirmed to show large inter regional variability and rates of bacterial resistance are changing because of increased use of antibiotics especially in developing countries.

Communicated by Erko Stackebrandt.

F. A. Ayeni · B. A. Adeniyi
Department of Pharmaceutical Microbiology,
University of Ibadan, Ibadan, Nigeria
e-mail: funmiyeni@yahoo.co.uk

S. T. Ogunbanwo
Department of Botany and Microbiology,
University of Ibadan, Ibadan, Nigeria

R. Tabasco · T. Paarup · C. Peláez
Department of Dairy Science and Technology,
Instituto del Frío (CSIC), Madrid, Spain

T. Requena (✉)
Department of Dairy Science and Technology,
Instituto del Frío (CSIC), Jose Antonio Novais 10,
28040 Madrid, Spain
e-mail: trequena@if.csic.es

Inhibition of uropathogens by lactic acid bacteria (LAB) is of special interest because of increasing level of antibiotics resistance by uropathogens (Guay 2008). There is growing evidence that LAB can inhibit the growth and attachment of uropathogens to uroepithelial cells (Reid and Bruce 2006) and the first major test to ascertain this is their ability to inhibit the growth of uropathogens to a large extent in vitro. The antagonistic activities demonstrated by LAB may be due to organic acids (Juárez-Tomás et al. 2003), hydrogen peroxide and bacteriocins (Aroutcheva et al. 2001). Other mechanisms proposed for their microbial antagonism are production of biosurfactants and other adhesion inhibitors (Velraeds et al. 2000), and stimulation of immune response (Maldonado Galdano et al. 2007). On the other hand, the LAB to be used for health benefits should demonstrate absence of virulence factors, e.g., transferable antibiotics resistance genes (Saarela et al. 2000).

The aims of this study were to isolate, identify and examine the antimicrobial resistance pattern of community acquired UTI (CA-UTI) pathogens in southwest Nigeria and also to isolate and identify LAB from indigenous fermented dairy food and cow's intestine in order to select LAB strains with remarkable antimicrobial activities against multi-drug-resistant uropathogens.

Materials and methods

Bacterial strains and media

Uropathogens bacteria

Forty-nine uropathogens were collected from urine of outpatients with CA-UTI at University College Hospital (UCH; Ibadan, Nigeria) and State Specialist Hospital (Ado Ekiti, Ekiti State, Nigeria), over a period of 6 months. Gram staining and biochemical tests were performed on the isolates at the hospitals for preliminary identification, but the following tests were done at the Instituto del Frío (Madrid, Spain) to confirm the identities of the isolates. Gram negative isolates were grown on Violet Red Bile Agar (VRBA; EMD, Darmstadt, Germany), from where the isolates with characteristic red, pink or purple colonies were further grown on Coli ID agar (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) to differentiate between *E. coli* and other coliforms. The non-coliform, Gram negative isolates were grown on *Pseudomonas* C.F.C. selective agar (EMD) according to the manufacturer's instructions. All isolates from *Pseudomonas* C.F.C. selective agar were grown on Baird Parker agar (BPA; Difco, Detroit, USA) and isolates with characteristic black colonies were further grown on Mannitol Salt Agar (MSA; Difco). All enterobacteria and

suspected *Pseudomonas* spp. were tested with API 20 E strips (BioMérieux) to complete species identification.

Lactic acid bacteria (LAB)

LAB strains were isolated from two sources. First, naturally fermented Nigerian dairy foods, viz., Nono (fermented skimmed milk), kidirimu (fermented whole milk), wara (cheese), raw cow's milk and whey. Secondly, small intestines of freshly killed cows. All the samples were collected from four states (Ekiti, Osun, Ondo and Oyo) in western Nigeria.

For all solid samples (cheese and cow's intestines), 1 g of sample was added to 9 ml of sterile diluent (0.1% peptone, 0.85% NaCl) and homogenized by vortex mixing. For liquid samples (Kidirimu, Nono, whey and raw milk), 1 ml of sample was added to 9 ml sterile diluent and homogenized by vortex mixing. From appropriate tenfold dilutions for each sample, growth of LAB was determined by inoculating in MRS agar (Oxoid, Basingstoke, UK), adjusted to pH 5 with 1 M HCl, by pour plate method and incubating for 48 h in a microaerophilic environment. Colonies were picked according to differences in their morphology on MRS agar plates and isolated by streaking onto MRS agar. Pure cultures were characterized according to colony and cell morphology, Gram-staining reaction, and catalase activity. Isolates tentatively identified as LAB were stored at -20°C in MRS broth with 50% (w/v) glycerol. The indicator strains used for determination of antimicrobial spectra (uropathogenic strains of *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa*) were propagated in Brain Heart Infusion broth (BHI; Oxoid) at 37°C in an aerobic environment.

Genetic identification of isolates

Sequencing of 16S rDNA from uropathogens

A representative of each genus of the biochemically identified Gram negative uropathogens was selected for further genetic identification. The DNA was extracted by Gen Elute™ Bacteria Genomic DNA kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) according to the manufacturer's instructions. The extracted DNA was then used as a template in PCR amplification with primers Y1 (5'-TGG CTC AGG ACG AAC GCT GGC GGC-3') (positions 20–43 on 16S rDNA *E. coli* numbering) and Y2 (5'-CCT ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3') (positions 361–338 on 16S rDNA *E. coli* numbering), based on prokaryotic conserved region embracing the V1 and V2 region of the 16S rRNA gene. Amplification was performed using the following conditions, 95°C for 5 min, 30 cycles at 94°C for 45 s, 56°C for

1 min, and 72°C for 45 s, followed by a final extension step at 72°C for 10 min. The PCR products were analyzed on 1% agarose gel in TAE buffer containing ethidium bromide and visualized under UV light. The PCR products were purified using the Gen Elute™ PCR Clean-up kit (Sigma-Aldrich). Automated sequencing of one strand of the PCR products was done at Secugen S.L. (Madrid, Spain) with primer Y1 in a gene sequencer ABI PRISM (Applied Biosystem, Foster City, USA). The basic local alignment search tool (BLAST) program was used to assess the identity of the sequences obtained with those held in GenBank database.

Amplification, restriction analysis and sequencing of 16S rDNA from LAB isolates

Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) was used to allow the differentiation of the variety of LAB strains showing antimicrobial activity (Table 1). The isolates were propagated in MRS broth and DNA was extracted using standard procedures for the analysis of 16S rDNA. The entire gene was amplified using the forward primer PMod (5'-CAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and the reverse primer PC5 (5'-CTCACTATAGGGATACCTTGTTACGACTT-3') using the PCR conditions described previously by Rodtong and Tannock (1993), which resulted in a product of approximately 1.6 kb. The PCR product was run in 1% agarose gel and analyzed for the yield of amplicons with the expected size. Restriction of the amplified product was carried out in 20 µl volumes of incubation buffer containing 5 U of *MseI* and the adequate volume of PCR product to get 500 ng DNA (2–10 µl). The reaction was incubated at 37°C for 1 h and then stopped at 65°C for 20 min. Restriction fragments patterns were analyzed in 2% agarose gel and visualized under UV light.

Representative strains of each contrasting pattern obtained by *MseI* restriction of the 16S rRNA gene were further analyzed for sequencing of the entire gene. The PCR product obtained as described above was purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and sequenced in both strands using two pairs of primers. The first half of the 16S rRNA gene was sequenced with the forward primer PMod and the reverse primer P3rev (5'-GGACTACTAGGGTATCTAAT-3') and the second half of the gene was sequenced with the forward primer 16mid-for (5'-GGCCGTTACTGACGCTGAG-3') and the reverse primer PC5 described below. Sequencing of PCR fragments was carried out at the DNA sequence service of the Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC (Madrid, Spain). The resulting sequences were used to search sequences deposited in database using BLAST algorithm. The identity of the strains was determined on the basis of the highest score.

Antibiotics sensitivity test

The susceptibility to antibiotics of the *Lactobacillus brevis*, *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis*, *Weissella* spp. strains and the uropathogens strains was tested through a microdilution method using a Sensi Test Gram Positive system and a Sensi Test Gram negative system (Liofilchem, Roseto, Italy) according to the manufacturer's instructions. The following antibiotics (grouped into three major families) were tested for Gram negative (uropathogens) isolates with the following breakpoint concentration (µg/ml). Aminoglycosides: amikacin (32), gentamicin (8), and tobramycin (8). β -Lactams: ampicillin/sulbactam (32/16), amoxicillin/clavulanic acid (32/16), mezlocillin (128), piperacillin/tazobactam (128/4), ticarcillin/clavulanic acid (128/2), cefoperazone (64), cefotaxime (64), ceftazidime

Table 1 Percentage of LAB isolated from different sources showing antimicrobial activity against two uropathogenic *S. aureus* strains

LAB source	Strains code	<i>S. aureus</i> FAA 37p			<i>S. aureus</i> FAA 38p			Origin	
		— ^a	+	++	—	+	++	Town	State
Cow's milk (3)	B	0 (0)	33 (1)	67 (2)	0 (0)	33 (1)	67 (2)	Okemesi-Ekiti	Ekiti
Nono (4)	L, O	0 (0)	50 (2)	50 (2)	50 (2)	50 (2)	0 (0)	Akure, Ondo	Ondo
Cheese (22)	C, E, G, AA, BB, EE, FF, GG, HH	14 (3)	54 (12)	32 (7)	45 (10)	41 (9)	14 (3)	Okemesi-Ekiti, Akinlalu, Iwo-Road, Ojoo	Ekiti, Osun, Ibadan-Oyo
Whey (28)	D, J, K, F, H, N, P, Q, CC, FF, GG, HH	21 (6)	36 (10)	43 (12)	36 (10)	43 (12)	21 (6)	Okemesi-Ekiti, Ijero-Ekiti, Akinlalu, Iwo-Road, Ojoo,	Ekiti, Osun, Ibadan-Oyo
Cow's intestine (39)	A, I, M, R, S, T, U, V, X, Y, Z, DD, EE	23 (9)	41 (16)	36 (14)	28 (11)	41 (16)	31 (12)	Okemesi-Ekiti, Ijero-Ekiti, Bodija, Gbongan, Ojoo, Itamerin, Dugbe	Ekiti, Ibadan-Oyo, Osun

^a Range of inhibition: —, diameter of inhibition zone <4 mm; +, 4–10 mm; ++, >10 mm. The number of strains is shown in parenthesis

(32), ceftriaxone (64), cefuroxime (32), and aztreonam (32). Quinolones: nalidix acid (32), lomefloxacin (8), ciprofloxacin (4), levofloxacin (8), and pefloxacin (8). Other families: teicoplanin (32), co-trimoxazole (8), nitrofurantoin (128), and fosfomycin (200).

For Gram positive isolates (LAB and uropathogenic *S. aureus*), the following antibiotics (grouped into four major families) with the following breakpoint concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$) were tested. Aminoglycosides: gentamicin (8), netilmicin (32), and tobramycin (8). β -Lactams: amoxicillin/clavulanic acid (8/4), ampicillin/sulbactam (32/16), piperacillin (16), cefaclor (32), cefixime (32), cefonicid (32), ceftazidime (32), ceftriaxone (64), and cefuroxime (32). Quinolones: ciprofloxacin (4), levofloxacin (8), and pefloxacin (8). Macrolides: azithromycin (8), clarithromycin (8), erythromycin (8), miokamycin (8), and roxitromycin (8). Other families: fosfomycin (200), rifampicin (4), and co-trimoxazole (8).

Determination of LAB antimicrobial activity

An overlay method (Magnusson and Schnurer 2001) was used to determine the ability of the isolated LAB strains (*L. brevis*, *E. faecium*, *L. lactis* and *Weissella* spp.) to inhibit the growth of various species of uropathogens. It was performed using MRS agar plates on which a loopful of LAB in MRS broth was inoculated as approximately 2 cm long lines. After incubation for 24 h at 37°C in a microaerophilic environment, the plates were overlaid with approximately 10^5 CFU/ml of the indicator uropathogens inoculated in 10 ml of BHI soft agar (0.7%). The plates overlaid with bacterial indicators were incubated at 37°C for 24 h in an aerobic environment. Finally, the plates were examined for clear zones of inhibition around the LAB streaks. The area of the inhibition zones was scored as follows: no suppression (–), inhibition zone <4 mm around the streak; weak suppression (+), inhibition zone of 4–10 mm; strong suppression (++), inhibition zone of 10–20 mm; and very strong suppression (+++), inhibition zone >20 mm.

Production of bacteriocin-like inhibitory substances by LAB strains

LAB strains that showed clear zones of antimicrobial activity were grown in MRS broth overnight at 37°C to test the production of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS). The culture was centrifuged at $12,000\times g$ for 10 min at 4°C, and the supernatant was neutralized to pH 6.2 with 1 M NaOH and filter sterilized through 0.45- μm pore-size filters. The antimicrobial activity of the cell-free supernatant was determined by an agar well diffusion assay. Aliquots (30 μl) of the supernatant were placed in wells (7-mm diameter), cut in cooled MRS agar plates. The supernatant

was allowed to dry for 1 h inside the wells at room temperature. The agar plates were covered with a lawn of 7 ml of soft MRS or BHI agar (0.7%) inoculated with 30 μl of an overnight culture of the indicator microorganisms (*Lactobacillus sakei* CECT 906 or clinical strains of uropathogenic *Staphylococcus aureus*) giving approximately 10^5 CFU/ml of cells. The plates were allowed to solidify and then incubated at 37°C for 24 h.

Cell-free supernatants were tested for BLIS resistance to different pH values and the enzymes catalase and chymotrypsin. The residual antimicrobial activity was determined using the agar well diffusion assay. For sensitivity studies at different pH values, the pH of cell-free supernatant of LAB were adjusted to 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 and 9.0 by adding 1 M NaOH and filter sterilized through 0.45 μm pore-size filters and then tested for antimicrobial activity. Catalase enzyme at 1 mg/ml was added to cell-free supernatants of the LAB strains and incubated at 25°C for 30 min before evaluating the antimicrobial activity. Sensitivity of BLIS to proteinases was assayed by incubating cell-free supernatant fluid with 1 mg/ml α -chymotrypsin in 10 mmol/l potassium phosphate buffer, pH 7.0 at 37°C for 1 h and then evaluated for residual antimicrobial activity.

Results

Identification of uropathogens and LAB isolates

The comparison of different methods for identification of uropathogens used in this study is shown in Table 2. Most of the phenotypic methods were able to identify the isolates to genus level and some methods were accurate to species level when compared with the standard genetic identification method (sequencing of 16S rDNA). *E. coli* accounted for approximately 45% of the total isolates. Other Gram negative isolates (*Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Proteus*) accounted for 35% of the total isolates, while *Staphylococcus* spp. accounted for 20% of the total isolates. In this study, only *Staphylococcus* spp. was isolated among Gram positive organisms implicated in UTI.

Ninety-six LAB strains were isolated from naturally fermented dairy foods and cow's intestines from four states in western Nigeria (Table 1). They were presumptuously identified as LAB based on their growth and morphology on MRS agar and Gram positive and catalase negative tests (result not shown). All strains were assayed for antimicrobial capacity against two uropathogenic *S. aureus* strains and screened for BLIS production against strains of *S. aureus* and *L. sakei*. Twenty-two LAB strains with strong suppression of target *S. aureus* strains, showing detectable clear zones (>10 mm) around the streaks (Table 1), and two

Table 2 Microorganisms distribution and comparison of methods for identification of uropathogens

Species	Isolates (%)	Identification method						
		VRBA	COLI ID	CFC	BPA	MSA	API 20E	16S rDNA
<i>Escherichia coli</i>	22 (44.8)	Coliform (Red colonies)	<i>E. coli</i> (Pink colonies)	NT	NT	NT	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
<i>Enterobacter</i> spp.	4 (8.2)	Coliform (Red colonies)	Coliform (Blue colonies)	NT	NT	NT	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>
<i>Citrobacter</i> spp.	2 (4.1)	Coliform (Purple colonies)	Coliform (Blue colonies)	NT	NT	NT	<i>C. freundii</i>	<i>C. freundii</i>
<i>Klebsiella</i> spp.	2 (4.1)	Coliforms (Pink colonies)	Coliform (Blue colonies)	NT	NT	NT	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. cloacae</i>
<i>Pseudomonas</i> spp.	5 (10.2)	–	NT	<i>Pseudomonas</i> spp.	NT	NT	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>Proteus</i> spp.	4 (8.2)	–	NT	–	<i>P. mirabilis</i> (Brown-black colonies)	NT	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. mirabilis</i>
<i>Staphylococcus</i> spp.	10 (20.4)	NT	NT	NT	<i>Staphylococcus</i> spp. (Shiny-black colonies)	<i>Staphylococcus</i> spp. (Red and Yellow colonies)	NT	NT
NT not tested, – no growth								

additional strains which produced BLIS against *L. sakei* were selected for species identification and further studies. The selected strains were nine LAB from cow's intestine, three LAB from cheese, eight LAB from whey, two from cow's milk and two from nono (Table 1).

To simplify the identification of the 24 LAB strains, the 16S rRNA gene of the selected strains was amplified and the product was restricted with *MseI*. Figure 1 shows the four contrasting patterns that came out from the migration of the restricted fragments in agarose gel. The entire 16S rRNA gene from eight representatives of the four contrasting patterns obtained by amplified 16S rDNA restriction analysis was sequenced. The four contrasting patterns were identified to match with the four genera: *Lactococcus*, *Weissella*, *Enterococcus* and *Lactobacillus* (Fig. 1). The sequenced genes identified the strains as two *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (AA1, HH1), two *Weissella confusa* (AA3, BB1), one *Weissella cibaria* (L3), one *Enterococcus faecium* (I4) and two *Lactobacillus brevis* (S4, U1). As a result, the remainder 17 LAB strains were tentatively identified according to their ARDRA pattern matching that of the sequenced strains.

Antibiotics susceptibility of LAB and uropathogen strains

Sixteen LAB strains (*L. brevis* U1 and S4, *E. faecium* I4, *L. lactis* AA1 and HH1, and 11 *Weissella* spp. strains) were tested against 23 antibiotics (Fig. 2). *E. faecium* and *L. brevis* strains were resistant to tobramycin, cefaclor, cefixime, ceftazidime, miokamycin, fosfomycin and co-trimoxazole whereas *L. lactis* were only resistant to miokamycin, rifampicin and co-trimoxazole. All *Weissella* spp. strains have 100% resistance to fosfomycin, tobramycin, cefaclor and co-trimoxazole.

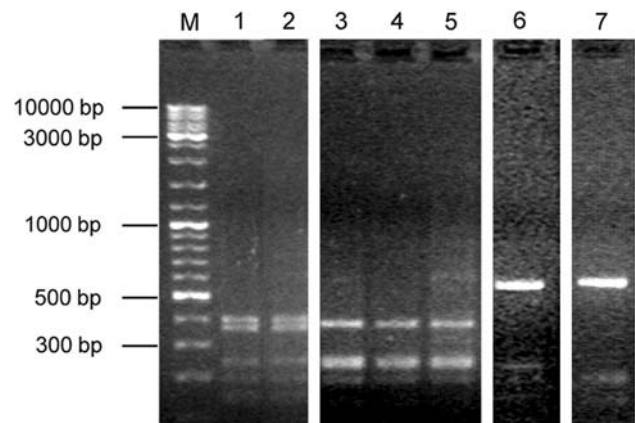
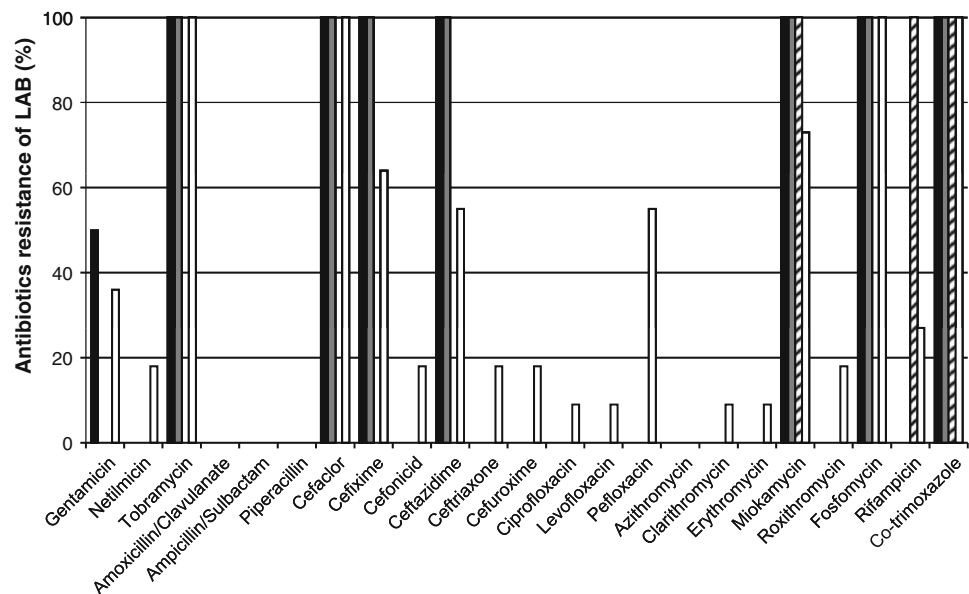


Fig. 1 ARDRA patterns of LAB isolates from restriction with *MseI*. Lane M molecular weight marker, lanes 1 and 2 *Lactococcus lactis* AA1 and HH1, lanes 3 and 4 *Weissella confusa* AA3 and BB1, lane 5 *Weissella cibaria* L3, lane 6 *Enterococcus faecium* I4, lane 7 *Lactobacillus brevis* S4

Fig. 2 Percentage antibiotics resistance pattern of LAB isolates: *Lactobacillus brevis* (black bars), *Enterococcus faecium* (gray bars), *Lactococcus lactis* (striped bars) and *Weissella* spp. (white bars)



On the other hand, all the uropathogens tested were resistant to at least one antibiotic. The 88% of the isolates were resistant to at least five antibiotics, 49% were resistant to at least 10 antibiotics, 20% uropathogens were resistant to at least fifteen antibiotics, 8% uropathogens were resistant to at least twenty antibiotics, while 2% uropathogens were resistant to 22 antibiotics (result not shown). The Gram negative isolates were highly resistant to the quinolones but had variable resistance to the β -lactams, while they were relatively susceptible to aminoglycosides. The Gram negative isolates exhibited 95% resistance to co-trimoxazole and 100% resistance to teicoplanin (Table 3). Each uropathogen species had different resistance pattern to different families of antibiotics. The *E. coli* strains were generally resistant to the quinolones. The highest rate of resistance (73%) was observed in lomefloxacin and ciprofloxacin, while the least percentage resistance (59%) was observed in levofloxacin and pefloxacin. However, *E. coli* was generally less resistant to the aminoglycosides with the least resistance (9%) observed in amikacin and the highest resistance (36%) in gentamicin. They were also relatively susceptible to the β -lactam antibiotics, except to mezlocillin with a high resistance rate of 73%. All *E. coli* isolates were susceptible to piperacillin/tazobactam. *Enterobacter cloacae* isolates showed variable resistance to the β -lactams (Table 3) with 50% resistance observed in 4 of the β -lactam antibiotics, while no *E. cloacae* isolate was resistant to ampicillin/sulbactam. They were generally less resistant to the aminoglycosides with 100% susceptibility to amikacin. Variable resistance was shown to the quinolones with 75% resistance to nalidix acid and pefloxacin and 25% resistance to lomefloxacin and levofloxacin. All the isolates showed 100% resistance to teicoplanin and co-trimoxazole and 75% resistance to fosfomycin and nitrofurantoin. All

the *Citrobacter* spp. were resistant to cefotaxime, cefuroxime, nalidix acid, teicoplanin and co-trimoxazole with variable resistance to the remaining tested antibiotics (Table 3). All the *Klebsiella pneumoniae* were sensitive to all the aminoglycosides used in this study. They were generally resistant to the quinolones while less resistance was observed to the β -lactams. All the isolates were resistant to teicoplanin, co-trimoxazole, fosfomycin and nitrofurantoin. No resistance was seen in *Pseudomonas aeruginosa* isolates to piperacillin/tazobactam, while all the isolates were resistant to amoxicillin/clavulanic acid, cefuroxime, teicoplanin and co-trimoxazole, and they showed resistance ranges between 20 and 80% to the remaining tested antibiotics. *Proteus mirabilis* isolates were 100% resistant to teicoplanin, aztreonam, co-trimoxazole, cefuroxime, ampicillin/sulbactam and amoxicillin/clavulanic acid, while all the species were susceptible to gentamicin. A resistance level ranging from 50 to 75% was observed in the remaining tested antibiotics used in this study.

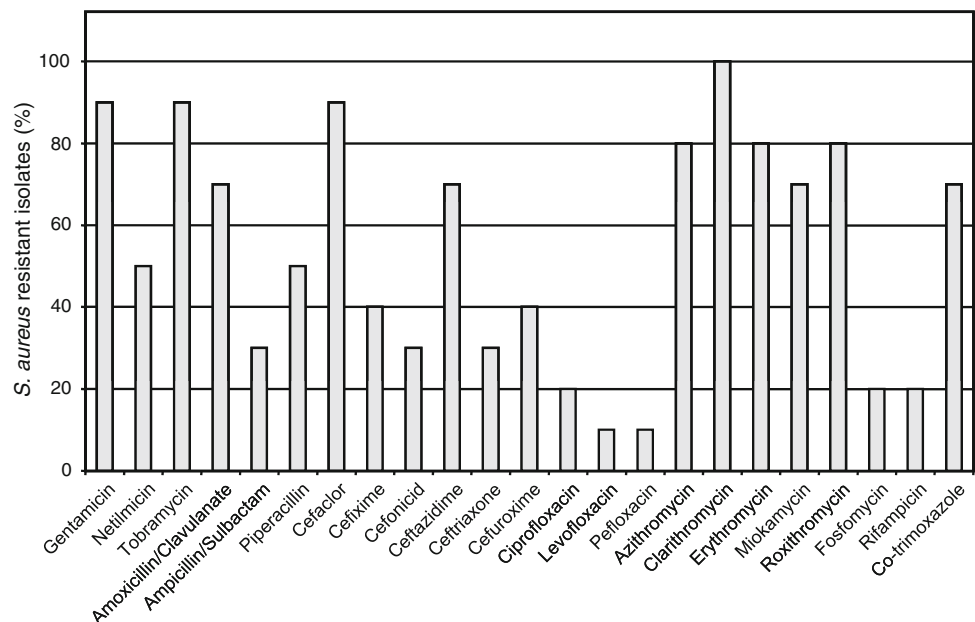
The *Staphylococcus* spp. were generally more resistant to antibiotics than the Gram negative isolates (Fig. 3). They were generally resistant to the macrolides with 100% resistance to clarithromycin. They were also resistant to the aminoglycosides (50–90% resistant isolates). Less resistance was observed in the quinolones (from 10 to 20%), while with the β -lactams they have variable resistance (from 30 to 90%). A 20% resistance was observed in fosfomycin and rifampicin while 70% resistance was observed in co-trimoxazole.

Characterization of the LAB antimicrobial activity

The highest occurrence of antimicrobial producing LAB did occur in *Weissella* spp. which made up more than 70%

Table 3 Percentage resistance of different Gram negative uropathogens to antibiotics

Antibiotic	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>Citrobacter</i> spp.	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>P. mirabilis</i>
Amikacin	9	0	50	0	40	50
Gentamicin	36	25	50	0	60	0
Tobramycin	23	25	0	0	60	75
Ampicillin/sulbactam	5	0	0	0	60	100
Amoxicillin/clavulanate	18	25	50	50	100	100
Mezlocillin	73	50	50	0	80	75
Piperacillin/tazobactam	0	25	0	0	0	50
Ticarcillin/clavulanate	5	25	50	0	60	75
Cefoperazone	36	25	50	0	60	75
Cefotaxime	14	25	100	0	60	50
Ceftazidime	5	50	0	0	40	75
Ceftriaxone	14	50	50	0	60	50
Cefuroxime	27	50	100	50	100	100
Nalidix acid	68	75	100	100	60	75
Lomefloxacin	73	25	50	100	60	75
Ciprofloxacin	73	50	50	100	40	75
Levofloxacin	59	25	0	50	20	50
Pefloxacin	59	75	0	50	20	50
Teicoplanin	100	100	100	100	100	100
Aztreonam	5	50	0	0	40	100
Co-trimoxazole	91	100	100	100	100	100
Fosfomycin	9	75	50	100	60	50
Nitrofurantoin	14	75	50	100	60	75

Fig. 3 Percentage antibiotics resistance pattern of *Staphylococcus aureus*

of the isolates. Seventeen *Weissella* spp. strains and two *L. brevis* strains were selected for further tests against seven strains of uropathogenic Gram negative isolates (Table 4). The largest inhibition (a clear zone of about 30 mm around the streak) was produced by *Weissella* sp. DD2 against *E.*

coli FAA 24P while no inhibition (<4 mm of growth suppression zone) was shown by two strains of *Weissella* sp. against *E. cloacae* FAA 68P. In general, the susceptibility of the studied Gram negative uropathogens to antimicrobial activity of LAB depended mostly on the target strain,

Table 4 Inhibition of uropathogens by *Weissella* spp. strains isolated from different sources

Strain	<i>C. freundii</i> FAA 5P	<i>E. coli</i> FAA 6P	<i>E. coli</i> FAA 24P	<i>P. mirabilis</i> FAA 42P	<i>E. cloacae</i> FAA 58P	<i>E. cloacae</i> FAA 68P	<i>P. aeruginosa</i> FAA 69P
<i>Weissella cibaria</i> L3	++ ^a	+	++	+++	+	+	++
<i>Weissella</i> sp. K3	++	+	+	++	+	++	++
<i>Weissella</i> sp. V1	+++	+	++	+++	+	+	++
<i>Weissella</i> sp. T2	+++	++	++	++	+	+	++
<i>Weissella</i> sp. X1	++	—	+++	+++	+	+	++
<i>Weissella confusa</i> AA3	++	+	++	++	+	+	+
<i>W. confusa</i> BB1	++	+	++	++	+	+	++
<i>Weissella</i> sp. B3	—	+	++	++	—	+	++
<i>Weissella</i> sp. HH1	+	++	+	+++	+	+	+++
<i>Weissella</i> sp. DD2	+	++	+++	+++	+	+	++
<i>Weissella</i> sp. I4	+	+	++	++	—	+	++
<i>Weissella</i> sp. R6	+++	+	++	++	+	—	++
<i>Weissella</i> sp. T1	+	++	+	++	+	+	++
<i>Weissella</i> sp. M2	++	+	++	+++	—	+	++
<i>Weissella</i> sp. P5	+++	+	++	+++	+	+	++
<i>Weissella</i> sp. F3	++	+	+++	++	+	—	++
<i>Weissella</i> sp. D3	++	++	++	++	+	++	+
<i>Lactobacillus brevis</i> U1	++	++	+	++	+	+	++
<i>L. brevis</i> S4	++	++	++	++	+	—	+

^a Range of inhibition: —, diameter of inhibition zone <4 mm; +, 4–10 mm; ++, 10–20 mm, +++, >20 mm

resulting in that *E. cloacae* strains showed the highest resistance to the inhibition caused by *Weissella* spp. and *L. brevis* (Table 4).

Out of the 96 LAB isolates screened, only two strains of *L. lactis* subsp. *lactis* produced a proteinaceous compound which is likely to be BLIS. The BLIS was active against *L. sakei* but had no activity against all strains of *S. aureus* tested. The BLIS was produced by the strains from 24 h to 72 h (i.e., throughout the stationary phase) without any change in inhibition halo diameter. Changing the pH of the crude BLIS within a range of 6.5–8.0 has little effect on its activity but, there was a decrease in the halo of inhibition at pH 6, 8.5 and 9.0. Antimicrobial activity of the two strains of *L. lactis* was completely destroyed after treatment of the culture supernatant with α -chymotrypsin while addition of catalase enzyme has no effect on its activity (results not shown).

Discussion

In this study, the identification of the uropathogens strains by phenotypic and genotypic methods was compared. Due to lack of materials, microbiologists in developing countries especially Africa rely on biochemical tests and growth on selective media to identify uropathogens. Often, these identification methods might be wrong thereby leading to

wrong prescription of antibiotics resulting in ineffectiveness. There is therefore the need to compare commonly used methods of identification in Africa with a standard genetic identification method in order to know the degree of accuracy of each method. To our knowledge, this is the first published manuscript comparing different identification methods commonly used in Africa for identification of uropathogens with a standard genetic method of identification. The predominant microorganisms responsible for CA-UTI in this study were *E. coli* followed by *Staphylococcus* spp. This agrees with the findings of Stamm and Hooton (1993). The trend of multi-drug-resistant uropathogens isolated in this study is similar to another study carried out in Ethiopia where about 68% of all isolates were resistant to two or more antimicrobial (Moges et al. 2002). Many factors contribute to occurrence of multi-drug resistant uropathogens in Africa including misuse of antibiotics, counterfeit drugs, shortfall in infection control and public health and also, the fact that many of the resistance genetic determinants are plasmid borne, thereby providing resistance to several other classes of antibiotics and transmission to other microorganisms. The high antibiotic resistance exhibited by the uropathogenic *Staphylococcus* spp. to aminoglycosides could be due to enzymatic modification of the amino or hydroxyl groups of the aminoglycosides (Mingeot-Leclercq et al. 1999). The quinolones (chiefly, ciprofloxacin) are the drugs of choice for treating UTI in many regions of the world but

all the Gram negative uropathogens used in this study displayed an unusually high resistant rate, with 67% of the isolates being resistant to ciprofloxacin and levofloxacin. Adeniyi and Amajoyi (2004) have also reported ciprofloxacin resistance in Southwest Nigeria. Green and Tillotson (1997) reported that increased resistance to ciprofloxacin in developing countries could be due to an increased selective pressure caused by the use of more ciprofloxacin. Besides, the high rate of resistance to co-trimoxazole (TMP-SMX) by Gram negative and positive uropathogens found in this study is very disturbing. This combination is widely used for UTI in Nigeria because of its low cost compared with other antibiotics. It is also commonly used as prophylaxis for HIV infected patients who have a high occurrence in Nigeria. This may account for a possible higher selective pressure on the agent therefore, accounting for increased rate of resistance. Huovinen et al. (1995) observed a clear trend in the resistance to TMP-SMX with strains isolated in the developing world being more often resistant than the strains isolated in the developed countries. The clinical significance of this finding is that resistance to co-trimoxazole has been associated with concurrent resistance to other antibiotics resulting in multi-drug resistant uropathogens (Zhanel et al. 2000). From the data available in this study, the best antibiotics for treatment of CA-UTI in southwest Nigeria are piperacillin/tazobactam and amikacin for Gram negative organisms and the fluoroquinolones for *Staphylococcus* spp., since their resistance rate are less than 20%. There seems to be an emergency of quinolone and co-trimoxazole resistance in southwest Nigeria. More studies that cover a wider geographical zone and a longer period of time are needed to confirm this resistance pattern. The increasing resistance of uropathogens to antibiotics demands for complementary UTI treatments.

On the other hand, as stated by Dellaglio and Felis (2005), phenotypic methods alone are inadequate for identification of LAB species. To achieve a rapid and reliable identification of the LAB species isolated from dairy foods and cow's intestines, isolates were analyzed by ARDRA and identification confirmed by 16S rDNA sequencing. The intestinal microbiota of human and animals is a complex mixture of bacteria so that interspecific competition for this ecological niche is consistently waged by intestinal bacteria. This makes the bacteria to have antimicrobial capacity as a survival tactic. The cow's intestinal antimicrobial producing LAB isolated in this research belongs to the genera *Weissella*, *Enterococcus* and *Lactobacillus*. In comparison to other LAB, few authors have demonstrated the antimicrobial capability of *Weissella* spp. against uropathogens. However, *W. cibaria* has demonstrated to inhibit dental biofilm formation (Kang et al. 2006) and genitourinary pathogens (Lee 2004). In this study, *Weissella* spp. showed the capability to inhibit the growth of seven species of

uropathogens to varying degree. On the other hand, two strains of *L. lactis* used in this study were able to produce BLIS throughout the stationary phase. However, the BLIS produced was not active against any of the Gram positive and negative uropathogens tested. A growing concern in the selection of probiotics strains is the transfer of resistance genes from animals to human through the food chain. Klare et al. (2007) and Aquilanti et al. (2007) reported cases of antibiotics resistance in LAB from animals and human isolates. This observed resistance might be advantageous or not depending on if the resistance is transferable. *Weissella* spp. strains in this study had 100% resistance to fosfomicin, tobramycin, cefaclor and co-trimoxazole. Most of these antibiotics are commonly used for treatment of UTI, therefore further studies should be addressed to analyze the safety dose and antibiotic resistance of the strains before using them in complementary treatments as a natural approach for uropathogens inhibition.

Acknowledgments We are grateful to the staffs of medical microbiology units of University College Hospital, Ibadan, Nigeria and State Specialist Hospital, Ado Ekiti, Nigeria for their assistance in isolates collection. F.A. Ayeni wishes to acknowledge the EMBO for the short-term fellowship grant during which some part of this work was done. Part of this work was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (grants: AGL2004-07285-C02-01 and Consolider FUN-C-FOD CSD2007-063) and Comunidad Autónoma de Madrid (ALI-BIRD: S-0505/AGR-0153).

References

- Adeniyi BA, Amajoyi CC (2004) Activity of sixteen antimicrobial agents and multidrug resistance of uropathogenic isolates from ciprofloxacin treated outpatients. *Afr J Med Pharm Sci* 8:8–17
- Aquilanti L, Garofalo C, Osimani A, Silvestri G, Vignaroli C, Clementi F (2007) Isolation and molecular characterization of antibiotic-resistant lactic acid bacteria from poultry and swine meat products. *J Food Prot* 70:557–565
- Aroutcheva A, Gariti D, Simon M, Shott S, Faro J, Simoes JA, Gurguis A, Faro S (2001) Defense factors of vagina lactobacilli. *Am J Obstet Gynecol* 185:375–379
- Dellaglio F, Felis GE (2005) Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. In: Tannock GW (ed) *Probiotics and prebiotics: scientific aspects*. Caister Academic Press, Norfolk, pp 25–49
- Garau J, Xercavins M, Rodríguez-Carballeira M, Gómez-Vera JR, Coll I, Vidal D, Llovet T, Ruiz-Bremón A (1999) Emergence and dissemination of quinolone-resistant *E. coli* in the community. *Antimicrob Agents Chemother* 43:2761–2841
- Green S, Tillotson G (1997) Use of ciprofloxacin in developing countries. *Ped Infect Dis* 16:150–159
- Guay DR (2008) Contemporary management of uncomplicated urinary tract infections. *Drugs* 68:1169–1205
- Gupta K, Sahm D, Mayfield D, Stamm WE (2001) Antimicrobial resistance among uropathogens that cause community-acquired urinary tract infections in women: a nationwide analysis. *Clin Infect Dis* 33:89–94
- Huovinen P, Sundstrom L, Swedberg G, Skold O (1995) Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 39:279–289

- Juárez-Tomás MS, Ocaña V, Wiese B, Nader-Macías ME (2003) Growth and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259. Inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. J Med Microbiol 52:1117–1124
- Kang MS, Chung J, Kim SM, Yang KH, Oh JS (2006) Effect of *Weissella cibaria* isolates on the formation of *Streptococcus mutans* biofilm. Caries Res 40:418–425
- Klare I, Konstabel C, Werner G, Huys G, Vankerckhoven V, Kahlmeier G, Hildebrandt B, Müller-Bertling S, Witte W, Goossens H (2007) Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. J Antimicrob Chemother 59:900–912
- Lee Y (2004) *Weissella confusa* strain PL9001 inhibits growth and adherence of genitourinary pathogens. J Microbiol Biotechnol 14:680–685
- Magnusson J, Schnurer J (2001) *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. Appl Environ Microbiol 67:1–5
- Maldonado Galdeano C, de LeBlanc A, Vinderola G, Bibas Bonet ME, Perdígón G (2007) Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. Clin Vaccine Immunol 14:485–492
- Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM (1999) Aminoglycosides: activity and resistance. Antimicrob Agents Chemother 43:727–737
- Moges F, Mengistu G, Genetu A (2002) Multiple drug resistance in urinary pathogens at Gondar College of Medical Sciences Hospital, Ethiopia. East Afr Med J 79:415–419
- Reid G, Bruce AW (2006) Probiotics to prevent urinary tract infections: the rationale and evidence. World J Urol 24:28–32
- Rodtong S, Tannock GW (1993) Differentiation of *Lactobacillus* strains by ribotyping. Appl Environ Microbiol 59:3480–3484
- Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Matto J, Mattila-Sandholm T (2000) Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J Biotechnol 84:197–215
- Stamm WE, Hooton TM (1993) Management of urinary tract infections in adults. N Engl J Med 329:1328–1334
- Velraeds MMC, van de Belt-Gritter B, Busscher HJ, Reid G, van der Mei HC (2000) Inhibition of uropathogenic biofilm growth on silicone rubber in human urine by lactobacilli—a teleologic approach. World J Urol 18:422–426
- Zhanel GG, Karlowsky JA, Harding GKM, Carrie A, Mazzulli T, Low DE, Hoban DJ (2000) A Canadian national surveillance study of urinary tract isolates from outpatients: comparison of the activities of trimethoprim-sulfamethoxazole, ampicillin, mecillinam, nitrofurantoin, and ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother 44:1089–1092

VI. *Lactobacillus acidophilus* La-5 AUMENTA LA PRODUCCIÓN DE LACTACINA B CUANDO “SIENTE” CIERTAS BACTERIAS VIABLES

Artículo publicado en *International Journal of Food Microbiology*



Lactobacillus acidophilus La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria

Raquel Tabasco, Tomás García-Cayuela, Carmen Peláez, Teresa Requena *

Department of Dairy Science and Technology, Instituto del Frío (CSIC), José Antonio Nováis 10, 28040, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 February 2009

Received in revised form 1 April 2009

Accepted 5 April 2009

Keywords:

Bacteriocin

Lactacin B

Lactobacillus acidophilus

Probiotic

Quorum sensing

ABSTRACT

Lactobacillus acidophilus La-5 is a probiotic strain used in dairy products. Production of bacteriocin by *L. acidophilus* La-5 was achieved when it was grown in co-cultures with the yogurt starter species *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. However, bacteriocin induction was not observed when heat-killed cells were used as inducers. This study demonstrates that *L. acidophilus* La-5 produces lactacin B and that the bacteriocin expression is controlled by an auto-induction mechanism involving the secreted peptide IP₁₈₀₀. The transcript level of the lactacin B gene cluster expression was investigated in co-cultures between *L. acidophilus* La-5 and *S. thermophilus* STY-31 and a remarkable increase of the bacteriocin structural gene (*lbaB*) transcription was observed. However, *lbaB* was transcribed constitutively in uninduced *L. acidophilus* La-5 cells, but the levels of the secreted bacteriocin were not enough to be detected by the agar diffusion assay. A new method for bacteriocin detection was formulated based on the monitoring on real time of *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* growth in presence of the supernatant and the cell wall extracts of pure and induced *L. acidophilus* La-5. These results showed that part of lactacin B secreted remains adhered to cell envelope.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Bacteriocins of lactic acid bacteria (LAB) are gene-encoded antimicrobial peptides with an apparent antagonistic function against those which inhabit the same environmental niche and consequently compete for the same resources (Claverys and Håvarstein, 2007; Eijsink et al., 2002). A recent revised classification of bacteriocins proposes their division into two distinct categories: the lanthionine-containing lantibiotics (class I) and the non-lanthionine-containing bacteriocins (class II) (Cotter et al., 2005). Increasing information associates production of a number of bacteriocins to a signaling process where an inducing peptide (IP) activates a two-component regulatory system composed of a histidine protein kinase and a response regulator (Eijsink et al., 2002; Kleerebezem et al., 1997; Oppegård et al., 2007). For most lantibiotics the bacteriocin itself acts as IP inducing its own production (Coburn et al., 2004; Kleerebezem, 2004; Schmitz et al., 2006; Upton et al., 2001). This common mechanism in the control of lantibiotic gene expression has been described as a 'nisin-type' positive auto-regulation (Rawlinson et al., 2002). Signaling process of class II bacteriocins regulation is characterized by the presence of an IP that shows many of the physico-chemical properties of the bacteriocins (pre-peptide processed via double-glycine leader sequences, exported via ATP-binding

cassette (ABC)-type transporters, active as small cationic peptide, etc.), acts as a pheromone, and integrates the so called three-component regulatory system (Eijsink et al., 2002; Oppegård et al., 2007; Turovskiy et al., 2007). The gene encoding the precursor of the IP and the genes encoding the proteins involved in the two-component regulatory system, and those involved in the secretion of the induction peptide, are transcriptionally linked, and the synthesis of induction peptide appears to be an autoregulatory process (Eijsink et al., 2002; Kleerebezem, 2004). The mechanism of autoinduction for regulation of bacteriocin production has been associated as a mechanism of quorum sensing. That means that cells produce an extracellular autoinducer molecule and simultaneously sense its concentration in their immediate environment. Once the concentration exceeds a threshold, gene expression is induced (Turovskiy et al., 2007).

Production of a bacteriocin by *Lactobacillus acidophilus* was first described by Barefoot and Klaenhammer (1983) and called it lactacin B. More recently, the genome sequence analysis of the strain *L. acidophilus* NCFM revealed the putative regions responsible for lactacin B production (Altermann et al., 2004; Fig. 1), which recently have been described to be organized as a regulated operon (Dobson et al., 2007). The majority of bacteriocins produced by *L. acidophilus* are heat-stable, low-molecular-mass and non-lantibiotic peptides which belong to class II bacteriocins (Bogovic-Matijasić et al., 1998; Chumchalová et al., 2004; Tahara et al., 1996a,b; Zamfir et al., 1999). *L. acidophilus* La-5 is a probiotic strain widely used in fermented milk manufacture (Shah, 2000; Tabasco et al., 2007). In the present study

* Corresponding author. Tel.: +34 915492300; fax: +34 915493627.

E-mail address: trequena@if.csic.es (T. Requena).

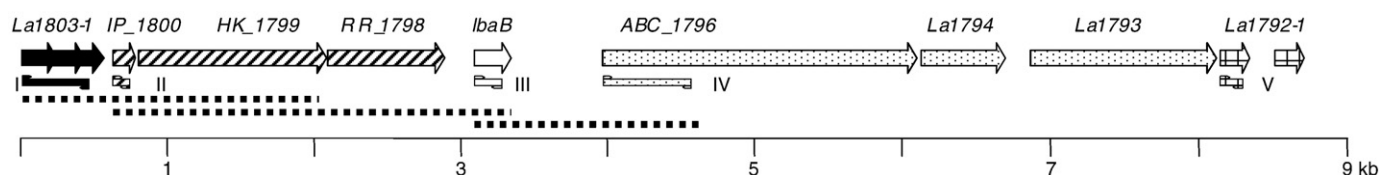


Fig. 1. Lactacin B gene cluster (Altermann et al., 2004). The PCR products obtained from *L. acidophilus* La-5 with primers designed to amplify the Lactacin B gene cluster distributed within five sections: the putative bacteriocin genes *La1801*, *La1802* and *La1803* (section I), the three-component regulatory system genes *IP_1800*, *HK_1799* and *RR_1798* (section II), the putative lactacin B structural gene *lbaB* (section III), the putative ABC-transporter and accessory protein genes *ABC_1796*, *La1794* and *La1793* (section VI) and the putative bacteriocin genes *La1791* and *La1792* (section V). The dashed lines indicate the transcripts obtained by RT-PCR with primers designed to amplify spanning intergenic regions.

we describe the identification of the bacteriocin produced by *L. acidophilus* La-5 and the conditions that regulate its production.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains, media and growth conditions

The bacteriocin producer used in this study was *L. acidophilus* La-5. Strains tested as inducers of bacteriocin production by *L. acidophilus* La-5 and as sensitive microorganisms are listed in Table 1. All *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 were grown in MRS broth (Pronadisa) supplemented with 0.05% L-cysteine hydrochloride, at 37 °C and under anaerobic conditions (Gas-Pack, Anaerogen, Oxoid Ltd.), excepting *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus casei* that were grown aerobically at 30 °C. *L. acidophilus* La-5 was incubated in a 20% CO₂ atmosphere incubator at 37 °C. *Streptococcus thermophilus* was grown at 37 °C in M17 broth (Pronadisa) containing 2% lactose. *Listeria innocua*, *Enterococcus* spp., and *E. coli* were grown in brain heart infusion (BHI) broth (Oxoid) at 37 °C. *Clostridium* spp. were grown in Bryant Burkey broth (Merck, Darmstadt, Germany) at 37 °C under anaerobic conditions. Solid media were prepared by adding 1.5% bacteriological agar (Scharlau) to the respective broth media. All strains were maintained as frozen stocks at –80 °C in the corresponding broth culture plus 20% glycerol.

2.2. Bacteriocin assays

The agar well diffusion assay was routinely used to detect antimicrobial activity in *L. acidophilus* La-5 supernatant cultures (Casla et al., 1996). Wells of 5 mm diameter were loaded with 50 µl of *L. acidophilus* culture supernatant obtained by centrifugation (10,000 ×g, 10 min), filtered through a 0.45 µm pore-size filter (Millipore) and adjusted to pH 6.0 with 0.1 M NaOH. Lawns of the

indicator strain (Table 1) were prepared by inoculating around 10⁷ cells in 5 ml of the respective soft-overlay (0.75% agar) medium, which was poured onto the surface of the respective agar plates. Zones of growth inhibition were measured after an overnight incubation. For quantitative determinations in the agar well diffusion assay, one bacteriocin unit was arbitrarily defined as the reciprocal of the highest dilution which showed a clear inhibition zone and was expressed as activity units (AU) per ml. The indicator organism used was *L. sakei* subsp. *sakei* CECT 906.

The antimicrobial activity of *L. acidophilus* La-5 was also quantified in a microtiter plate assay system (Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific) using *L. sakei* subsp. *sakei* CECT 906 as indicator strain. Each well of the microtiter plate contained 50 µl of a two-fold serial dilution in MRS of the *L. acidophilus* culture supernatant and 250 µl of a 1000-fold-diluted culture of the indicator strain (ca. 10⁵ bacteria per well). The plates were incubated at 30 °C for 36 h and bacterial growth was measured spectrophotometrically at 600 nm at 1 h-intervals. The bacteriocin unit (BU) was arbitrarily defined as the amount of bacteriocin that reduced the maximal specific growth rate of the indicator strain by 50% and expressed as BU/ml. The specific growth rate (h⁻¹) was obtained by measuring the OD at 600 nm (OD₆₀₀) and calculated as $\mu = \Delta \ln OD / \Delta t$ from five consecutive OD₆₀₀ measurements.

Thermostability of the antibacterial activity was determined by heating cell-free supernatant fluids obtained from inhibitory cultures at 110 °C for 10 min. They were then cooled and tested for residual activity. Sensitivity of antimicrobial compounds to proteinases was assayed by incubating cell-free supernatant fluids, previously neutralized with 0.1 M NaOH and filter-sterilized, with 1 mg/ml α-chymotrypsin (Sigma) in 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, at 37 °C for 1 h. Residual activity of samples was determined by the agar well diffusion assay.

2.3. Extraction of bacteriocin from *L. acidophilus* cell walls

Bacteriocin adsorption to *L. acidophilus* La-5 cells was also explored. Cells from overnight MRS broth cultures were harvested by centrifugation (ca. 10⁸ cells/ml), suspended in MilliQ water, mixed (1/1; v/w) with glass beads and disrupted with FastPrep FP120 (Bio101 Savant Instruments Inc.) at a setting of 5.5 m/s for three intervals of 45 s each with 1 min cooling intervals. Glass beads and whole cells were removed by centrifugation at 1,000 ×g for 5 min, and the cell walls were recovered from the supernatant by centrifugation at 21,000 ×g for 15 min. The bacteriocin adsorbed to the cell walls was extracted by washing the pellet in succession with 85% ethanol, 50% isopropanol and 8 M urea plus 0.1% SDS. Inhibitory activity extracted from the cell walls was quantified by the microtiter plate assay. Solutions of ethanol, isopropanol, urea and SDS at appropriate concentrations were used as controls.

2.4. Induction and autoinduction assays

Induction of bacteriocin expression was assayed by co-culturing *L. acidophilus* La-5 with the indicator strains listed in Table 1. Co-cultures were carried out in MRS broth that was inoculated with 2% of an overnight culture of *L. acidophilus* La-5 plus 2% of an overnight culture

Table 1
Induction and antimicrobial spectra of *L. acidophilus* La-5.

Microorganism	Induction	Sensitivity
<i>Streptococcus thermophilus</i> STY-31	+	–
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LB-27	+	+
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CECT 4005	+	–
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> CECT 282	+	+
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> LC-01	–	–
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> CECT 906	+	+
<i>L. sakei</i> subsp. <i>carnosus</i> CECT 5766	ND	+
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12	–	–
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> CECT 4011	–	–
<i>C. tyrobutyricum</i> CECT 4012	–	–
<i>Clostridium sporogenes</i> CECT 892	–	–
<i>C. sporogenes</i> CECT 553	–	–
<i>Listeria innocua</i> BL 86/26	–	–
<i>Enterococcus faecium</i> CECT 410	–	–
<i>Enterococcus durans</i> CECT 411	–	–
<i>Enterococcus faecalis</i> CECT 481	–	–
<i>E. coli</i> DH5α	–	–
<i>E. coli</i> MC1061	–	–
<i>E. coli</i> O157H [–]	–	–

ND = not determined.

of the inducer strain and incubated in a 20% CO₂ atmosphere incubator at 37 °C. Bacteriocin induction by heat-killed cells was performed in MRS inoculated with 2% *L. acidophilus* La-5 by adding 2% of an overnight culture of the inducing strain that was previously heat treated at 80 °C for 20 min, 100 °C for 5 min, and at 121 °C for 15 min. Bacteriocin activity was assayed in the co-culture supernatants by the agar well diffusion assay as described above. Two-fold dilutions of supernatants were made with fresh MRS broth whereas concentration of supernatants was carried out by evaporation with a SpeedVac SPD111V (ThermoSavant) and by resuspending the residue in fresh MRS broth to the desired concentration.

The auto-induction activity was tested using a chemically synthesized inducing peptide IP₁₈₀₀. The IP₁₈₀₀ amino acid sequence (KKAPISGYVGRGLWENLSNIFKHHK) was deduced from the IP₁₈₀₀ gene containing an N-terminal double glycine leader motif described in the lactacin B gene operon of *L. acidophilus* NCFM (Altermann et al., 2004), and that was followed by two genes encoding a predicted histidine kinase protein (HK₁₇₉₉) and a response regulator (RR₁₇₉₈). The 25 amino acids mature peptide IP₁₈₀₀ was synthesized at the Facility for Peptide Synthesis at the Molecular Biology Centre-Severo Ochoa (CBMSO-CSIC, Madrid, Spain). The IP₁₈₀₀ was purified to >97% homogeneity by reverse-phase HPLC with an acetonitrile-H₂O gradient. The molecular weight of the purified peptide (2880 Da) was verified by laser desorption mass spectrometry. To assay biological activity, 1 mg/ml stock solution of IP₁₈₀₀ was prepared in autoclaved milliQ water and added at final concentrations ranging from 0.1 to 500 ng/ml to a growing culture of *L. acidophilus* La-5 at early log phase (OD₆₀₀ 0.2–0.3). Samples from both induced and uninduced *L. acidophilus* La-5 cultures were collected at different points along the growth curve and used for bacteriocin activity analyses and RNA isolation.

2.5. DNA isolation and PCR

The genomic DNA from *L. acidophilus* La-5 was isolated as described by Meile et al. (2001). The primers used in this study were designed from the lactacin B gene cluster identified in the *L. acidophilus* NCFM genome sequence (Accession number CP000033; 2) and are listed in Table 2. To deal with the identification of the 9.4 kb lactacin B gene cluster in *L. acidophilus* La-5, the primers were designed to amplify five defined sections (Fig. 1). Primers La1803-for and La1801-rev were used to check the presence in *L. acidophilus* La-5 of the putative bacteriocin genes *La1801*, *La1802* and *La1803* (section I); primers IP1800-for and IP1800-rev were used to check the three-component regulatory system genes *IP₁₈₀₀*, *HK₁₇₉₉* and *RR₁₇₉₈* (section II); primers LactB-for and LactB-rev for the putative lactacin B structural gene *lbaB* (section III); primers ABC1796-for and ABC1796-rev for the putative ABC-transporter and accessory protein genes *ABC₁₇₉₆*, *La1794* and *La1793* (section VI); and primers La1792-for and La1792-rev for the putative bacteriocin genes *La1791* and *LBA1792* (section V). The reaction mixture (50 µl) contained 200 µM of each deoxynucleoside triphosphate, 0.4 µM of each primer, 1.5 mM MgCl₂, 1 × reaction buffer, 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (Roche) and 500 ng of genomic *L. acidophilus* La-5. The amplification program was as follows: 94 °C for 3 min, 35 cycles of 94 °C for 30 s, 60 °C for 20 s and 72 °C for 20 s, and a final extension time of 72 °C for 5 min. The products (5 µl) were separated on a 2% agarose gel and analyzed for the yield of amplicons with the expected sizes (Table 2). Sequencing of PCR fragments extracted from 0.7% agarose gels with QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) was performed by the DNA Sequence Service (Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC, Madrid, Spain).

2.6. RNA isolation and RT-PCR

Isolation of total RNA from *L. acidophilus* La-5 was performed with the mirVana miRNA Isolation kit (Ambion, Applied Biosystems). The

Table 2
Primers used in this study.

Primer	Sequence (5'–3')	Amplicon size (bp)
<i>Cluster gene identification</i>		
La1803-for	ATGCAGGAATGGAAGAAGACTAC	450
La1801-rev	GGACGCCATGGAGGAATAC	
IP1800-for	GTTGTTAAGAAGACTGTTTGA	111
IP1800-rev	ATTACTAGGTTTCCCATAG	
LactB-for	TTGAGTTATGTAATTGGTGGAG	181
LactB-rev	CTGCTGAGCCTTTGATAACG	
ABC1796-for	TTGCGGTGTGCTGCTTTG	590
ABC1796-rev	AACCGATGGCTAGAATTGATAAGG	
La1792-for	ATTATTATTACTGAGAACAAA	149
La1792-rev	TTCTCCAATAAACATCT	
<i>RT-PCR analysis</i>		
La1803-for	ATGCAGGAATGGAAGAAGACTAC	2066
HK1799 RT-rev	TACTCATCATCTTACCATCTTCC	
IP1800-for	GTTGTTAAGAAGACTGTTTGA	2660
LactB-rev	CTGCTGAGCCTTTGATAACG	
LactB-for	TTGAGTTATGTAATTGGTGGAG	1489
ABC1796-rev	AACCGATGGCTAGAATTGATAAGG	
ABC1796-for	TTGCGGTGTGCTGCTTTG	4731
La1791 RTi-rev	CATATAATCCTTTTGCTCCACAG	
<i>Real-Time RT-PCR analysis</i>		
Acid for (16S)	AGCGAGCTGAACCAACAGAT	227
Acid rev (16S)	AGGCCGTTACCTACCAACT	
La1801 RTi-for	GTTATTGGTGGCCGAAGAGA	131
La1801-rev	GGACGCCATGGAGGAATAC	
IP1800-for	GTTGTTAAGAAGACTGTTTGA	111
IP1800-rev	ATTACTAGGTTTCCCATAG	
LactB-for	TTGAGTTATGTAATTGGTGGAG	181
LactB-rev	CTGCTGAGCCTTTGATAACG	
ABC1796 RTi-for	TATCTAACGCCAATGGAACAACA	151
ABC1796 RTi-rev	GCATTGCTTCCATTCCATACT	
La1791 RTi-for	TTAAGTAATATTGCTGGGGGAAGT	145
La1791 RTi-rev	CATATAATCCTTTTGCTCCACAG	

procedure was modified to accommodate mechanical lysis by using the FastPrep apparatus before isolating the RNA. Cells were harvested at different times along the growth curve. Before centrifugation (10,000 ×g, 10 min), the cells were treated with RNA protect bacteria reagent (Qiagen) to ensure stability of total RNA. Isolated RNA was treated with DNase Treatment and Removal Reagents (Ambion) to eliminate DNA from the samples and the cDNA was synthesized by using ThermoScript RT-PCR (Invitrogen). The RNA was used as a template to generate first strand cDNA in reaction mixtures (20 µl) containing 400 ng of RNA, 50 µM Oligo(dT), 10 mM dNTP mix, 5 × cDNA Synthesis Buffer, 0.1 M DTT, 40 U RNase OUT and 15 U ThermoScript RT. Reverse transcription was performed at 50 °C for 60 min, and this was followed by inactivation of the reverse transcriptase by incubation at 85 °C for 5 min. The cDNAs were used as templates in RT-PCRs to test for the amplification of overlapping regions spanning the gene sections defined within the lactacin B operon (Fig. 1) and using the primers described in Table 2. Primers La1803-for and HK1799 RT-rev were used to amplify regions spanning the putative bacteriocin gene *LBA1801* and the histidine kinase protein gene *HK₁₇₉₉*; primers IP1800-for and LactB-rev for the region spanning the IP gene *IP₁₈₀₀* and the lactacin B structural gene *lbaB*; primers LactB-for and ABC1796-rev for the region between gene *lbaB* and the putative ABC-transporter gene *ABC₁₇₉₆*; and primers ABC1796-for and La1791 RTi-rev for the region between the gene *ABC₁₇₉₆* and the putative bacteriocin gene *La1791*. The PCR was as described above but using the annealing temperature of 50 °C for each primers pair and the extension time at 72 °C of 1 min for the first 10 cycles and increased by 1 min every 10 cycles. Control reactions consisted of DNase-treated RNA to check absence of contaminating DNA in the samples.

2.7. Quantification of gene expression by real-time RT-PCR

Bacteriocin gene expression in *L. acidophilus* La-5 was assayed in pure culture, induced culture by addition of 5 ng/ml of synthesized IP₁₈₀₀, and in co-culture with either 2% living or autoclaved cells of *S. thermophilus* STY-31. Samples were collected at different points along the growth curve and RNA was extracted as described above. Quantitative PCR was performed with the synthesized cDNAs by using an iQTM5 Multicolor Real-Time PCR detection system (Bio-Rad). The reaction mixture (25 µl) contained 2 µl of cDNA used as a template, 0.5 µl of each primer (20 µM) and 12.5 µl master mixture IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). The PCR parameters for amplification included a hot start (95 °C for 3 min) followed by 40 cycles of denaturation (95 °C for 10 s), annealing and extension (60 °C for 30 s) and finally the melting curve profile (60–95 °C at 0.5 °C/s). The specific primers used to amplify ca. 100–200 bp fragments representing each of the defined sections I, II, III, IV and V (Fig. 1) are shown in Table 2. No-template and DNase-treated RNA were used as controls. The 16 S rRNA gene (Table 2) was used for normalization of data. Results were recorded as threshold cycles (C_T) and expressed using the comparative critical threshold (ratio = $2^{-\Delta\Delta C_T}$) method (Livak and Schmittgen, 2001).

3. Results

3.1. Characteristics of the bacteriocin produced by *L. acidophilus* La-5

Our previous findings regarding viability of LAB mixed cultures in fermented milk revealed that viability of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBY-27 was reduced when growing with *L. acidophilus* La-5 (Tabasco et al., 2007). This result pointed out to the potential production by *L. acidophilus* La-5 of a bacteriocin-like inhibitory substance. Inhibitory activity of *L. acidophilus* La-5 however was not detected in cell-free culture supernatants and only was revealed by the formation of an inhibitory halo surrounding the grown colonies using the agar layer method and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBY-27 as target seeded in the overlay (Fig. 2A). The results suggested that bacteriocin production could be induced by co-culture with sensitive strains. Indeed, Fig. 2B shows that both yogurt starter culture species, *S. thermophilus* and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, induced bacteriocin production by *L. acidophilus* La-5. However, induction of bacteriocin production was not observed when heat-killed cells were used in the co-cultures with *L. acidophilus* (Fig. 2C).

Antimicrobial and induction spectra of *L. acidophilus* La-5 were analyzed using the strains shown in Table 1. *L. acidophilus* La-5 was found to display inhibitory activity against taxonomically related bacteria and sensitive strains were limited to members of the genus

Lactobacillus. The analyses indicated that strain induction capacity and sensitivity to the bacteriocin were not apparently related. In view of its highest sensitivity, *L. sakei* subsp. *sakei* CECT 906 was used as target strain for bacteriocin activity in further co-culture assays and for quantitative determinations of bacteriocin activity. The cell-free supernatant of co-cultures of *L. acidophilus* La-5 and *S. thermophilus* STY-31 kept inhibitory activity when it was neutralized to pH 7. In contrast, the proteolytic enzyme α -chymotrypsin caused total inactivation of the inhibitory activity (results not shown). The inhibitor was stable during heat treatment at 110 °C for 10 min. These observations indicated that the inhibitor produced by *L. acidophilus* La-5 was a thermostable peptide.

3.2. Induction of bacteriocin production

S. thermophilus and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* are regular starter cultures for fermented milks and therefore strains from these species were evaluated for inducing bacteriocin production by *L. acidophilus* La-5. Inducing and bacteriocin producing strains were inoculated at 2%. The results showed that both strains induced bacteriocin activity after 5–6 h of co-culture incubation (40–80 AU/ml), which corresponded with the end of the *L. acidophilus* La-5 log-phase growth (results not shown). *L. acidophilus* La-5 bacteriocin production in co-cultures caused a bacteriostatic effect on *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBY-27 but it did not affect the growth of *S. thermophilus* STY-31 (results not shown). Heat-killing of the inducer cultures prior to their addition to *L. acidophilus* La-5 culture resulted in lack of bacteriocin induction (Fig. 2C). Growth of *L. acidophilus* La-5 in the filter-sterilized supernatant of a *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *S. thermophilus* overnight culture, neutralized and re-supplemented with glucose and amino acids, did not cause induction of bacteriocin production (results not shown). Therefore, induction of bacteriocin production by *L. acidophilus* La-5 was only promoted when live cells were used in the co-cultures. Based on an apparent higher capacity of *S. thermophilus* STY-31 to induce *L. acidophilus* La-5 bacteriocin production, this strain was used for further co-culture assays for determination of bacteriocin expression.

Auto-induction of bacteriocin production was assayed by adding chemically synthesized mature peptide IP₁₈₀₀ at increased concentrations (0, 0.1, 1, 5, 10, 20, 40, 100, 500 ng/ml) to an early log phase growth of *L. acidophilus* La-5 pure culture. The induction of bacteriocin production was peptide-dose dependent, observed by minimal detection of bacteriocin (20 AU/ml) in *L. acidophilus* La-5 cell-free supernatants as early as 1 h after addition of 5 ng/ml IP₁₈₀₀ and after 2 h incubation with 0.1 ng/ml. IP₁₈₀₀ addition above 10 ng/ml did not vary appreciably results of *L. acidophilus* La-5 bacteriocin production.

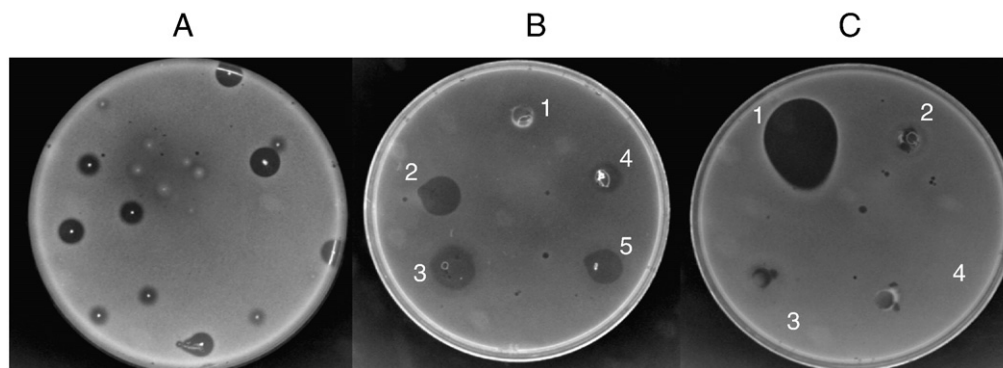


Fig. 2. Agar well diffusion assay for lactacin B detection from (A) *L. acidophilus* La-5 colonies, (B) the supernatant of *L. acidophilus* La-5 pure culture (1) and in co-culture with *S. thermophilus* STY-31 inoculated at 2% (2) and 0.5% (3) or with *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBY-27 inoculated at 2% (4) and 0.5% (5), and (C) the supernatant of *L. acidophilus* La-5 co-culture with *S. thermophilus* STY-31 live cells (1), heat-treated at 80 °C, 20 min (2), 100 °C, 5 min (3), and 121 °C, 15 min (4). *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBY-27 (A) and *L. sakei* subsp. *sakei* CECT906 (B,C) were used as indicator strains.

3.3. Genetic determination of the *L. acidophilus* La-5 bacteriocin cluster

A search in literature resulted in that the 24 amino acids sequenced from the N-terminal region of the purified acidocin J1132 produced by *L. acidophilus* JCM 1132 (Tahara et al., 1996b) shared 100% homology with the N-terminal amino acid sequence of the purified acidocin CH5 produced by *L. acidophilus* CH5 (Chumchalová et al., 2004) and with the N-terminal amino acid deduced sequence of the mature peptide encoded by gene *LBA1797* (after a Gly–Gly presumed processing site) from the lactacin B gene cluster identified in the *L. acidophilus* NCFM genome (Altermann et al., 2004). To confirm the identity of the bacteriocin produced by *L. acidophilus* La-5, a PCR assay using a forward primer (LactB-for; Table 2) designed from the nucleotide sequence within the amino acids shared by lactacin B, acidocin J1132 and acidocin CH5 and a reverse primer designed from the *LBA1797* nucleotide sequence (LactB-rev; Table 2) was performed. A positive amplification product of the expected size was obtained (Fig. 3). The product was sequenced and it was found to be 100% identical to the *LBA1797* gene nucleotide sequence, indicating that *L. acidophilus* La-5 produces lactacin B. Therefore, the gene *LBA1797* was renamed *lbaB*. PCR analyses using primers targeting the other four defined lactacin B gene cluster sections I, II, IV, and V (see material and methods; Fig. 1) also gave positive amplification products in *L. acidophilus* La-5 of the corresponding expected sizes (Fig. 3). The nucleotide sequence of the products was 100% identical to the corresponding genes in the *L. acidophilus* NCFM lactacin B gene cluster. The results indicated that the organization of the lactacin B encoding region is similar in *L. acidophilus* La-5 and NCFM strains. These five gene sections were also targeted in the studies of bacteriocin expression in *L. acidophilus* La-5.

3.4. Analysis of lactacin B gene cluster transcription

To determine whether the lactacin B genes were co-transcribed as a single polycistronic mRNA, cDNA products generated from total RNA extracted from cells induced in co-cultures with *S. thermophilus* were used as PCR templates in RT-PCRs to test for the amplification of overlapping regions spanning the *La1803* and *HK_1799* genes, the *IP_1800* and *lbaB* genes, the *lbaB* and *ABC_1796* genes, and the *ABC_1796* and *La1791* genes (Fig. 1). A PCR product was obtained from each amplification reaction using the corresponding primer pairs, excepting from the amplification using primers designed from the putative ABC-transporter encoding gene (*ABC_1796*) and the putative bacteriocin encoding gene *La1791* that did not yield any product. The estimated PCR product sizes obtained corresponded to the expected

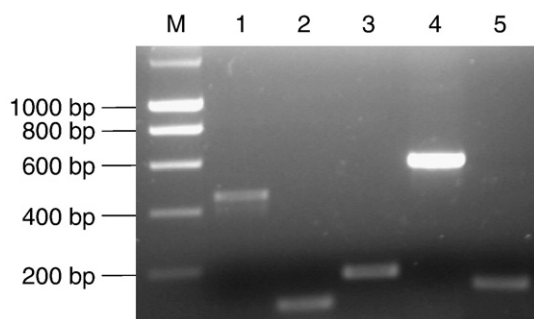


Fig. 3. Amplification products obtained from *L. acidophilus* La-5 by PCR with primers designed in the lactacin B gene cluster. Lane M, molecular weight marker; lane 1, amplicon obtained using *La1803*-for and *La1801*-rev primers spanning section I (putative bacteriocin genes); lane 2, amplicon obtained using *IP_1800*-for and *IP_1800*-rev primers representing section II (three-component regulatory genes); lane 3, amplicon obtained using *LactB*-for and *LactB*-rev primers representing section III (lactacin B structural gene); lane 4, amplicon obtained using *ABC_1796*-for and *ABC_1796*-rev primers representing section IV (transport and secretion genes); and lane 5, amplicon obtained using *La1792*-for and *La1792*-rev primers representing section V (putative bacteriocin genes).

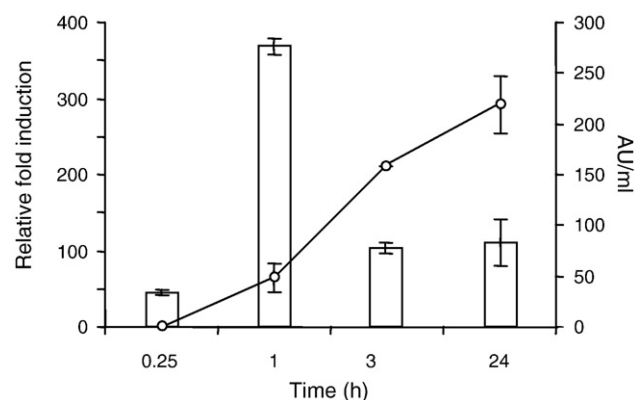


Fig. 4. Relative fold induction (bars) as determined by real-time RT-PCR of *lbaB* expression by *L. acidophilus* La-5 in response to 5 ng/ml *IP_1800* compared to the strain growing in absence of the induction peptide. Bacteriocin production (AU/ml; ○) by induced *L. acidophilus* La-5 was detected by the agar well diffusion assay using *L. sakei* subsp. *sakei* CECT906 as indicator strain.

products as deduced from the complete sequence of the putative lactacin B gene cluster (results not shown). The results indicated that lactacin B induction, production and secretion encoding genes are located on a single transcript.

Quantitative real-time RT-PCR experiments were performed to calculate the transcription level of induction in gene expression on genes representing the five genetic sections (I to V) defined within the lactacin B operon (Fig. 1) by addition of 5 ng/ml of chemically synthesized mature peptide *IP_1800* to *L. acidophilus* La-5 pure cultures. Gene *lbaB* (section III), encoding the putative lactacin B structural gene, increased its transcription level upon addition of *IP_1800* (Fig. 4), with no significant transcription increase of the other genes tested (results not shown). The increase of *lbaB* gene transcription was detected as earlier as 15 min after addition of *IP_1800* and expression was maximal after 1 h of *IP_1800* addition. The increased transcription level of the gene *lbaB* was followed by an increasing detection of bacteriocin activity in the induced *L. acidophilus* La-5 cell-free supernatant (Fig. 4).

Relative levels of expression of the *IP_1800* gene in the putative IP and regulation encoding gene cluster (section II), the putative lactacin B structural gene (gene *lbaB*, section III), and the *ABC_1796* gene in the putative transport encoding gene cluster (section IV) were compared between *L. acidophilus* La-5 grown in pure culture and in co-cultures with *S. thermophilus* STY-31 or with autoclave-killed *S. thermophilus* STY-31 cells. We observed increase of gene expression only in co-cultures of *L. acidophilus* La-5 with *S. thermophilus* living cells. The highest difference in gene expression was determined for gene *lbaB* (Fig. 5), whereas a relatively low increase of expression was observed

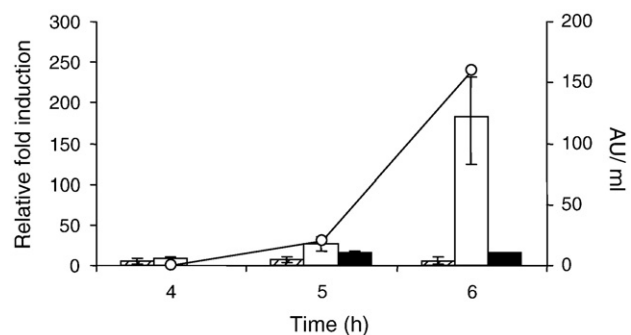


Fig. 5. Relative fold induction as determined by real-time RT-PCR of *IP_1800* (striped bars), *lbaB* (open bars), and *ABC_1796* (solid bars) expression by *L. acidophilus* La-5 growing in co-culture with *S. thermophilus* STY-31 compared to *L. acidophilus* La-5 pure culture. Bacteriocin production (AU/ml; ○) by *L. acidophilus* La-5 in the co-culture was detected by the agar well diffusion assay using *L. sakei* subsp. *sakei* CECT906 as indicator strain.

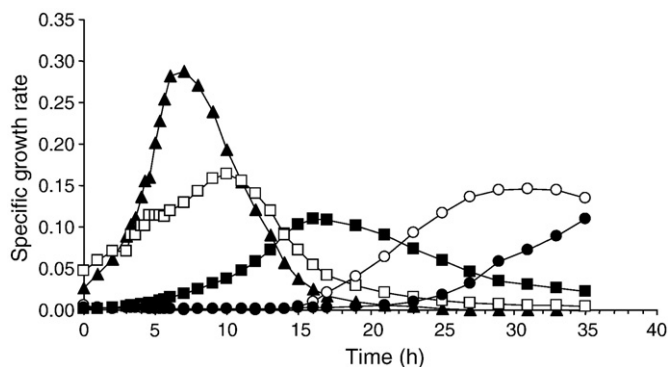


Fig. 6. Specific growth rate μ (h^{-1}), calculated as the slope of five adjacent OD_{600} measurements ($\Delta \ln \text{OD} / \Delta t$), of *L. sakei* CECT906 during incubation with the maximum dilution of supernatants or extracted cell walls that gave a 50% reduction of the indicator strain maximal growth rate. No addition of supernatant or cells (control; ▲), 5-fold concentrated supernatant of *L. acidophilus* La-5 pure culture (■), 16-fold diluted supernatant of *L. acidophilus* La-5 culture induced with 5 ng/ml IP_1800 (●), bacteriocin extracted from 2-fold diluted *L. acidophilus* La-5 cell-walls (□), and bacteriocin extracted from 8-fold diluted cell-walls of *L. acidophilus* La-5 induced with 5 ng/ml IP_1800 (○).

for the other two genes *IP_1800* and *ABC_1796*, encoding the IP_1800 precursor and the putative ABC-transport protein, respectively. The highest expression of gene *lbaB* corresponded with the highest bacteriocin detection in the co-culture cell free supernatant. The relative low transcription level of *ABC_1796* in comparison with that of *lbaB* indicated that increase of the expression level of the transport genes is not required for the secretion of large amounts of bacteriocin. No bacteriocin activity was detected in *L. acidophilus* La-5 pure cultures or in co-cultures of the strain with heat-killed *S. thermophilus* STY-31 cells. However, a basal level of transcription of the bacteriocin gene *lbaB* was observed in both cultures (results not shown).

3.5. Extraction of bacteriocin from *L. acidophilus* La-5 cells

As indicated above, transcription analysis of *L. acidophilus* La-5 pure cultures revealed a constitutive expression of the lactacin B structural gene. Negative amplification of the corresponding RNA controls demonstrated absence of contaminating DNA in the samples. The results suggested that in uninduced *L. acidophilus* La-5 cultures either the bacteriocin was not released to the culture supernatant or the level of bacteriocin expressed was not detected by the agar well diffusion assay, or both. To address these possibilities, a new method for bacteriocin detection was formulated based on the monitoring on real time of the target strain (*L. sakei* subsp. *sakei* CECT 906) growth in presence of the supernatant and the cell wall extracts of pure and induced *L. acidophilus* La-5 cultures. The extraction of bacteriocin from culture cells was tried by washing the cell walls with organic solvents such as 85% ethanol and 50% isopropanol that had been used for the chromatographic purification of *L. acidophilus* bacteriocins (Deraz et al., 2005; Zamfir et al., 1999) or with 8 M urea and 0.1% SDS that has been used for lactacin B elution in gel chromatography (Barefoot and Klaenhammer, 1984). The ethanol and isopropanol soluble extracts of *L. acidophilus* La-5 cell walls did not give positive results for bacteriocin activity. However, the mixture of urea 8 M and 0.1% SDS was able to remove bacteriocin from the cell walls of both induced and uninduced *L. acidophilus* La-5 cells. Fig. 6 shows the results of specific growth rate of *L. sakei* subsp. *sakei* CECT 906 during incubation with the maximum dilution of supernatants or extracted cell walls that gave a 50% reduction of the target maximal growth rate. Results with the microplate assay showed that a 5-fold concentrated supernatant of *L. acidophilus* La-5 pure cultures caused a 50% reduction of *L. sakei* subsp. *sakei* CECT 906 maximal specific growth. The results shown in Fig. 6 indicate that part of the bacteriocin secreted by *L. acidophilus* La-

5 grown in pure cultures would stay adhered to cell walls (40 BU/ml) and not released to the supernatant (4 BU/ml). The induction of bacteriocin expression with IP_1800 did release 320 BU/ml bacteriocin to the supernatant, whereas 160 BU/ml bacteriocin was still adhered to the cell walls. Bacteriocin activity (BU/ml) in both supernatants and cell wall extracts did correspond to ca. 10^8 *L. acidophilus* La-5 cells. Autoclaved whole cells from IP_1800 induced *L. acidophilus* La-5 cultures caused also a measurable decrease of *L. sakei* subsp. *sakei* CECT 906 growth, which showed an extension of the time to growth detection by 8 h and a reduction of maximal specific growth by 70% (results not shown). Autoclaved cells from pure *L. acidophilus* La-5 cultures also caused an effect on *L. sakei* growth, represented by a lengthening in 2 h of the time to growth detection and a reduction of maximal specific growth by 80%. As a whole, the results demonstrated that uninduced *L. acidophilus* La-5 produces bacteriocin and part of it remains adhered to the cell wall.

4. Discussion

Bacteriocins produced by *L. acidophilus* have in common a very narrow inhibitory spectrum, as observed with lactacin B produced by *L. acidophilus* La-5 (Table 1) and *L. acidophilus* NCFM (Barefoot and Klaenhammer, 1983), the lactacin B homologous bacteriocins acidocin CH5 and acidocin J1132 (Chumchalová et al., 2004; Tahara et al., 1996b), acidocin 8192 (Tahara et al., 1996a) and acidophilin 801 (Zamfir et al., 1999), among other characterized *L. acidophilus* bacteriocins. Likewise, increased production of *L. acidophilus* bacteriocins to be isolated from broth cultures has required the optimization of environmental factors such as control of growth pH (Barefoot and Klaenhammer, 1983; Bogovic-Matijasić et al., 1998; Chumchalová et al., 2004; Tahara et al., 1996b). The stress caused by an electric field induces an increase in production of bacteriocin by *L. acidophilus* (Loghavi et al., 2008). In this report, detection in broth culture of *L. acidophilus* La-5 bacteriocin production required the presence of viable bacteria. As well as the inhibitory spectrum, the inducers were bacteria closely related to the bacteriocin producer that are capable of competing for the same resources, although induction capacity and sensitivity to the bacteriocin are not apparently related (Table 1; Maldonado et al., 2004b). Increase of lactacin B production by *L. acidophilus* NCFM in co-culture with *L. delbrueckii* subsp. *lactis* was previously reported by Barefoot et al. (1994). The responsible agent was cell wall-associated and identified as a protein of 58 kDa. Later on, Ulrich and Hughes (2001), cloned and expressed the proposed lactacin B inducer protein (a triosephosphate isomerase TPI) defined by Barefoot et al. (1994), but their results did not support the previously published bacteriocin-inducing effect of the *L. delbrueckii* subsp. *lactis* TPI protein. Interestingly, the cell surface-associated TPI of *Staphylococcus aureus* initiates this bacteria antimicrobial effect against *Cryptococcus neoformans* (Ikeda et al., 2007). Recently, Chang et al. (2007) identified as presumably inducer of bacteriocin production by *L. plantarum* KFRI 464 the N-terminal region of the 30 S ribosomal S16 protein. The N-terminal sequence of the inducing factor was synthesized and examined for the induction of kimchicin GJ7 activity, and was found to induce activity, but at a level about 10% lower than that of the entire molecule. Although there are no conclusive results concerning a specific environmental factor responsible for bacteriocin induction mediated by cell to cell contact, the results indicate that the inducer factor is cell wall-associated since induction is promoted when live cells are used in the co-cultures but it is not observed with cell-free supernatants of the inducing strains (this study; Barefoot et al., 1994; Maldonado et al., 2004a,b; Rojo-Bezares et al., 2007).

In this study, we have demonstrated that the expression of lactacin B is also controlled by an auto-induction mechanism involving the addition of the secreted peptide IP_1800 that forms part of a three-component regulatory system encoded in the lactacin B operon (Fig. 1;

Altermann et al., 2004; Dobson et al., 2007). When IP_1800 was added to an exponentially growing culture of *L. acidophilus* La-5, transcription of *lbaB* gene was markedly increased. The other genes involved in regulation (monitored by IP_1800) and transport (monitored by ABC_1796) were expressed at lower levels. The increase in expression of the *lbaB* gene was not transient and remained elevated from 1 h and onwards. The appearance of the *lbaB* transcript correlated well with the appearance of bacteriocin activity in the culture medium (Fig. 3). This result and the fact that the putative mature encoded peptide *lbaB* has 100% homology with the N-terminal amino acids sequenced from *L. acidophilus* bacteriocins CH5 and acidocin J1132 (Chumchalová et al., 2004; Tahara et al., 1996b), identifies *lbaB* as the lactacin B bacteriocin structural gene. In this regard, Dobson et al. (2007) failed to identify the lactacin B structural gene during the characterization of the *L. acidophilus* NCFM bacteriocin operon. The transcript level of the lactacin B gene cluster expression was also investigated in co-cultures between *L. acidophilus* La-5 and *S. thermophilus* STY-31. A remarkable increase of the bacteriocin structural gene transcription level was again observed, but no other gene transcripts were induced at the same level as the bacteriocin. Analysis of the lactacin B operon transcription using RT-PCR (this study; Dobson et al., 2007) has suggested that the lactacin B genes are transcribed in a single transcript. The results we have found using quantitative RT-PCR also indicate that in induced *L. acidophilus* cells the gene *lbaB* is additionally transcribed from its own promoter. The intrinsic terminator ($\Delta G = -10.9$ kcal/ml) located downstream of RR_1798 identified by Dobson et al. (2007) could specifically participate in the regulation of expression of the *lbaB* gene. The presence of stem-loop structures is a feature of a number of regulated bacteriocinogenic systems, such as mersacidin (Altena et al., 2000), sakacin A (Axelsson and Holck, 1995) sakacin P (Mathiesen et al., 2005), nisin (Kuipers et al., 1993), lactacin 3147 (Cotter et al., 2006), or AS-48 (Fernández et al., 2008) where notable differences in concentrations between transcripts of the structural gene and of those genes involved in biosynthetic machinery have also been reported. On the other hand, lactacin B gene was transcribed constitutively in uninduced *L. acidophilus* La-5 cells, but the levels of expression of the secreted bacteriocin were not enough to be detected by the agar diffusion assay method. Besides, in this study we have shown that part of the bacteriocin secreted remains adhered to the cell wall. Lactacin B has five consecutive cationic amino acids at the C-terminal side of the peptide, feature that would allow the secreted peptide to establish a strong electrostatic interaction with the negatively charged phospholipids in bacterial cell membranes (Cotter et al., 2005; Netz et al., 2002; Oppegård et al., 2007; Stark et al., 2002). As a matter of fact, the affinity of bacteriocins for cell membranes forces the producers to build a mechanism of self-protection based on the simultaneous expression of an immunity protein able to form a strong complex with the receptor protein and the bacteriocin, thereby preventing producer cells from being killed (Cotter et al., 2005).

In conclusion, under uninduced conditions the constitutive level of lactacin B expression releases bacteriocin to a concentration that is lower to the minimum detection level measurable by standard assay tests. In presence of live resource-competitive targets, *L. acidophilus* responds to the environmental changes by increasing the basal level of expression of the lactacin B operon. About at the end of the log phase of growth (5–6 h in this study) the IP_1800 secreted would accumulate above the threshold concentration necessary to activate the regulatory system resulting in the increase of the bacteriocin gene *lbaB* expression. The increase of lactacin B transcription with the presence of other cells could suit in the efficiency sensing hypothesis proposed by Hense et al. (2007). Based on it, the autoinduction of bacteriocin production would respond only when target cells are alive and coexist in the same environment with the bacteriocin producer. The term combines efficiency and cooperation, since more than one cell responds to the same autoinducer.

L. acidophilus La-5 is a well known probiotic bacteria widely used in fermented milk products (Shah, 2000; Tabasco et al., 2007) that has demonstrated benefits in the ability of colonization and competition in the intestinal tract (Jain et al., 2004; Venus et al., 2008). In this study we have demonstrated that the strain produces lactacin B when it grows in co-cultures with *S. thermophilus* and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, species used as starter cultures for yogurt manufacture.

Acknowledgement

This work was funded by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (Grants: AGL2004-07285-C02-01, AGL2006-12100 and Consolider FUN-C-FOD CSD2007-063) and Comunidad Autónoma de Madrid (ALIBIRD: S-0505/AGR-0153).

References

- Altena, K., Guder, A., Cramer, C., Bierbaum, G., 2000. Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a type B lantibiotic gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2565–2571.
- Altermann, E., Russell, W.M., Azcarate-Peril, M.A., Barrangou, R., Buck, B.L., McAuliffe, O., Souther, N., Dobson, A., Duong, T., Callanan, M., Lick, S., Hamrick, A., Cano, R., Klaenhammer, T.R., 2004. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 3906–3912.
- Axelsson, L., Holck, A., 1995. The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *Journal of Bacteriology* 177, 2125–2137.
- Barefoot, S.F., Klaenhammer, T.R., 1983. Detection and activity of Lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 45, 1808–1815.
- Barefoot, S.F., Klaenhammer, T.R., 1984. Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin Lactacin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 26, 324–328.
- Barefoot, S.F., Chen, Y., Hughes, T.A., Bodine, A.B., Shearer, M.Y., Hughes, M.D., 1994. Identification and purification of a protein that induces production of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 3522–3528.
- Bogovic-Matijasic, B., Rogelj, I., Nes, I.F., Holo, H., 1998. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49, 606–612.
- Casla, D., Requena, T., Gómez, R., 1996. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and artisanal cheeses: characteristics of a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* IFPL105. *Journal of Applied Bacteriology* 81, 35–41.
- Chang, J.Y., Lee, H.J., Chang, H.C., 2007. Identification of the agent from *Lactobacillus plantarum* KFRI464 that enhances bacteriocin production by *Leuconostoc citreum* GJ7. *Journal of Applied Microbiology* 103, 2504–2515.
- Chumchalová, J., Josephsen, J., Plocková, M., 2004. Characterization and purification of acidocin CH5, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* CH5. *Journal of Applied Microbiology* 96, 1082–1089.
- Claverys, J.P., Håvarstein, L.S., 2007. Cannibalism and fratricide: mechanisms and reasons d'être. *Nature Reviews. Microbiology* 5, 219–229.
- Coburn, P.S., Pillar, C.M., Jett, B.D., Haas, W., Gilmore, M.S., 2004. *Enterococcus faecalis* senses target cells and in response expresses cytolyisin. *Science* 306, 2270–2272.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews. Microbiology* 3, 777–788.
- Cotter, P.D., Deegan, L.H., Lawton, E.M., Draper, L.A., O'Connor, P.M., Hill, C., Ross, R.P., 2006. Complete alanine scanning of the two-component lantibiotic lactacin 3147: generating a blueprint for rational drug design. *Molecular Microbiology* 62, 735–747.
- Deraz, S.F., Nordberg, Karlsson, E., Hedström, M., Andersson, M.M., Mattiasson, B., 2005. Purification and characterization of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. *Journal of Biotechnology* 117, 343–354.
- Dobson, A.E., Sanosky-Dawes, R.B., Klaenhammer, T.R., 2007. Identification of an operon and inducing peptide involved in the production of lactacin B by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Applied Microbiology* 103, 1766–1778.
- Eijsink, V.G.H., Axelsson, L., Diep, D.B., Håvarstein, L.S., Holo, H., Nes, I.F., 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria: an example of biological warfare and communication. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 639–654.
- Fernández, M., Sánchez-Hidalgo, M., García-Quintáns, N., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., López, P., Maqueda, M., 2008. Processing of as-48ABC RNA in AS-48 enterocin production by *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology* 190, 240–250.
- Hense, B.A., Kuttler, C., Müller, J., Rothballer, M., Hartmann, A., Kreft, J., 2007. Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? *Nature Reviews* 5, 230–239.
- Ikeda, R., Saito, F., Matsuo, M., Kurokawa, K., Sekimizu, K., Yamaguchi, M., Kawamoto, S., 2007. Contribution of the mannan backbone of *Cryptococcus glaucuronoxylomannan* and a glycolytic enzyme of *Staphylococcus aureus* to contact-mediated killing of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Bacteriology* 189, 4815–4826.
- Jain, P.K., McNaught, C.E., Anderson, A.D., MacFie, J., Mitchell, C.J., 2004. Influence of synbiotic containing *Lactobacillus acidophilus* La5, *Bifidobacterium lactis* Bb 12,

- Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* and oligofructose on gut barrier function and sepsis in critically ill patients: a randomised controlled trial. *Clinical Nutrition* 23, 467–475.
- Kleerebezem, M., 2004. Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides* 25, 1405–1414.
- Kleerebezem, M., Quadri, L.E.N., Kuipers, O.P., de Vos, W.M., 1997. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology* 24, 895–904.
- Kuipers, O.P., Beerthuyzen, M.M., Siezen, R.J., de Vos, W.M., 1993. Characterization of the nisin gene cluster *nisABTCIPR* of *Lactococcus lactis*. Requirement of expression of the *nisA* and *nisI* genes for development of immunity. *European Journal of Biochemistry* 216, 281–291.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT) Method. *Methods* 25, 402–408.
- Loghavi, L., Sastry, S.K., Yousef, A.E., 2008. Effect of moderate electric field frequency on growth kinetics and metabolic activity of *Lactobacillus acidophilus*. *Biotechnology Progress* 24, 148–153.
- Maldonado, A., Jiménez-Díaz, R., Ruiz-Barba, J.L., 2004a. Induction of plantaricin production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after coculture with specific gram-positive bacteria is mediated by an autoinduction mechanism. *Journal of Bacteriology* 186, 1556–1564.
- Maldonado, A., Jiménez-Díaz, R., Ruiz-Barba, J.L., 2004b. Production of plantaricin NC8 by *Lactobacillus plantarum* NC8 is induced in the presence of different types of gram-positive bacteria. *Archives of Microbiology* 181, 8–16.
- Mathiesen, G., Huehne, K., Kroeckel, L., Axelsson, L., Eijssink, V.G.H., 2005. Characterization of a new bacteriocin operon in sakacin P-producing *Lactobacillus sakei*, showing strong translational coupling between the bacteriocin and immunity genes. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 3565–3574.
- Meile, L., Rohr, L.M., Geissman, T.A., Herensperger, M., Teuber, M., 2001. Characterization of the D-xylulose 5-phosphate/D-fructose 6-phosphate phosphoketolase gene (*xfp*) from *Bifidobacterium lactis*. *Journal of Bacteriology* 183, 2929–2936.
- Netz, D.J.A., Bastos, M.C.F., Sahl, H.G., 2002. Mode of action of the antimicrobial peptide aureocin A53 from *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 5274–5280.
- Oppegård, C., Rogne, P., Emanuelsen, L., Kristiansen, P.E., Fimland, G., Nissen-Meyer, J., 2007. The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 13, 210–219.
- Rawlinson, E.L.A., Nes, I.F., Skaugen, M., 2002. LasX, a transcriptional regulator of the lactocin S biosynthetic genes in *Lactobacillus sakei* L45, acts both as an activator and a repressor. *Biochimie* 84, 559–567.
- Rojas-Bezares, B., Sáenz, Y., Navarro, L., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F., Torres, C., 2007. Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must. *Food Microbiology* 24, 482–491.
- Schmitz, S., Hoffmann, A., Rudd, B., Bierbaum, G., 2006. The lantibiotic mersacidin is an autoinducing peptide. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 7270–7277.
- Shah, N.P., 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science* 83, 894–907.
- Stark, M., Liu, L., Deber, C.M., 2002. Cationic hydrophobic peptides with antimicrobial activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 3585–3590.
- Tabasco, R., Paarup, T., Janer, C., Peláez, C., Requena, T., 2007. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. *International Dairy Journal* 17, 1107–1114.
- Tahara, T., Oshimura, M., Kanatani, K., 1996a. Mode of action of acidocin 8912, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* TK8912. *Letters in Applied Microbiology* 23, 192–194.
- Tahara, T., Oshimura, M., Umezawa, C., Kanatani, K., 1996b. Isolation, partial characterization, and mode of action of acidocin J1132, a two-component bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM1132. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 892–897.
- Turovskiy, Y., Kashtanov, D., Paskhover, B., Chikindas, M.L., 2007. Quorum sensing: fact, fiction, and everything in between. *Advances in Applied Microbiology* 62, 191–234.
- Ulrich, R.L., Hughes, T.A., 2001. Cloning and expression analysis of the 28 kDa protein from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4797 hypothesized to influence lactacin B production. *Journal of Applied Microbiology* 91, 1067–1073.
- Upton, M., Tagg, J.R., Wescombe, P., Jenkinson, H.F., 2001. Intra- and interspecies signalling between *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus pyogenes* mediated by SalA and SalA1 lantibiotic peptides. *Journal of Bacteriology* 183, 3931–3938.
- Venus, C., Goll, R., Loken, E.B., Biong, A.S., Halvorsen, D.S., Florholmen, J., 2008. Prevention of antibiotic-associated diarrhoea by a fermented probiotic milk drink. *European Journal of Clinical Nutrition* 62, 299–301.
- Zamfir, M., Callewaert, R., Cornea, P.C., Savu, L., Vatafu, I., De Vuyst, L., 1999. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB801. *Journal of Applied Microbiology* 87, 923–931.

**VII. METABOLISMO FERMENTATIVO DE BACTERIAS
LÁCTICAS Y BIFIDOBACTERIAS. INHIBICIÓN DE LA
COLONIZACIÓN DE ENTEROPATÓGENOS POR
*Lactobacillus acidophilus***

Artículo enviado a *Food Microbiology*

**Fermentative metabolism of lactic acid bacteria and
bifidobacteria. Inhibition of enteropathogens colonization by
Lactobacillus acidophilus.**

**Raquel Tabasco, Pilar Fernández de Palencia, Javier Fontecha, Carmen Peláez
and Teresa Requena***

*Department of Dairy Science and Technology, Instituto del Frío (CSIC), José Antonio
Novais 10, 28040 Madrid, Spain*

*Corresponding author. Tel.: +34915492300; fax: +34915493627.

E-mail address: trequena@if.csic.es (T. Requena)

Abstract

Enzyme activities (α - and β -glucosidases, α - and β -galactosidases and β -fructofuranosidase) and organic acid production of four species of lactic acid bacteria (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*) and *Bifidobacterium lactis* were tested on milk and medium with glucose, lactose or fructooligosaccharides (FOS) as carbon source. *B. lactis*, *L. acidophilus* and *L. casei* grew on FOS as the only carbon source and *B. lactis* was the only species exhibiting all the enzyme activities assayed. All the species showed β -galactosidase activity on lactose and FOS but the highest β -galactosidase activity was found in *L. acidophilus* growing on milk. α -Glucosidase activity was increased with FOS by *B. lactis*, *L. acidophilus* and *L. casei*. Lactate and acetate were the major organic acids produced by lactic acid bacteria and bifidobacteria, respectively. However, a metabolic shift toward more acetate and formate production, at the expense of lactate production, was observed during growth of *L. casei* on FOS. *L. acidophilus* showed the highest production of lactate when grown on FOS as sole carbon source. In addition, *L. acidophilus* demonstrated properties involving resistance to colonization against the intestinal pathogens *E. coli* and *S. enteritidis* in competition assays.

Keywords: Fructooligosaccharides; Galactosidases; Glucosidases; Probiotics; Colonization resistance.

1. Introduction

Fermented milk products are the most popular means of delivering probiotic bacteria in food. Among them, strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis* predominate in commercial probiotic products (Gueimonde et al., 2004; Masco et al., 2005; Tabasco et al., 2007). Prebiotics are closely associated with probiotics given that they are defined as fermentable substrates that selectively stimulate the growth and/or activity of the intestinal bacteria that contribute to health and well-being (Gibson et al., 2004). Three types of carbohydrates are usually classified as prebiotics, namely inulin-type fructans, trans-galacto-oligosaccharides, and lactulose (Gibson et al., 2004). Fructooligosaccharides (FOS) are oligosaccharides of D-fructose units linked by a β -(2, 1) glycosidic linkage, with a terminal glucose or fructose unit. Not all probiotic bacteria commonly used as food ingredients are able to metabolize FOS (Shene et al., 2005). A variety of bifidobacteria and lactobacilli have been studied to ferment inulin-type fructans (Barrangou et al., 2006; Goh et al., 2006; Van der Meulen et al., 2006). *B. lactis* has been studied to first utilize the shorter oligosaccharides in a FOS-mixture making use of a cytoplasmic β -fructofuranosidase (Janer et al., 2005). Similarly, *L. acidophilus* hydrolyses FOS via intracellular hydrolysis (Barrangou et al., 2003). On the other hand, the β -fructosidase of *L. casei* is cell-wall associated (Goh et al., 2007). Other carbohydrolytic enzymes described in bifidobacteria are essential for the degradation of substrates such as α -galactosyloligosaccharides (i.e. raffinose and stachyose) by α -galactosidases, oligosaccharides derived from starch and other α -glucosides by α -glucosidases, and lactose and lactose-derived substrates by β -galactosidases (Van der Broek et al., 2008).

The production of organic acids, mainly acetate and lactate, as the end products of carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria (LAB) and bifidobacteria are

implicated in the inhibitory effect of these bacteria against Gram-negative bacteria and their invasion capability of intestinal cells (Makras et al., 2006; Makras and De Vuyst, 2006). Other mechanisms proposed for the inhibitory activity of LAB and bifidobacteria are the production of hydrogen peroxide (Falagas et al., 2007), bacteriocins (Gillor et al., 2008), biosurfactants and other adhesion inhibitors (Velraeds et al., 2000), and stimulation of immune response (Maldonado Galdeano et al., 2007).

In the present work we have analyzed the fermentative metabolism of LAB and bifidobacteria growing on different carbohydrates and FOS. Their glucosidase, galactosidase and fructofuranosidase activities and the inhibition of enteropathogens colonization were also analyzed.

2. Material and methods

2.1 Bacterial strains and culture conditions

Lactic acid bacteria (LAB) and bifidobacteria strains used in the study were *Streptococcus thermophilus* STY-31, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBY-27, *L. acidophilus* LA-5, *L. casei* LC-01 and *B. lactis* BB-12. *S. thermophilus* was propagated in ESTY broth (Pronadisa, Madrid, Spain) containing 2% lactose. *Lactobacillus* spp. and *B. lactis* were grown under anaerobic conditions (Gas-Pack, Anaerogen; Oxoid Ltd., Hampshire, England), except for *L. casei* that was grown aerobically in MRS fermentation broth (Pronadisa), which contains neither glucose nor meat extract, supplemented with 2% glucose and 0.05% L-cysteine hydrochloride. Incubations were carried out for 18-24 h at 37 °C, excepting *L. casei* that was incubated at 30 °C. Glucose (Pronadisa), lactose (Sharlau) and oligofructose (Raftilose P95; Orafiti, Belgium) were filter-sterilized (0.45 µm) and added to the growth culture of LAB and bifidobacteria as the sole carbon source in concentration of 10 g l⁻¹. Raftilose

P95 (FOS) contained 95% fructan oligosaccharides, with degree of polymerization ranging between 2-7, and 5% of a mixture of glucose, fructose and saccharose. The five strains were also grown on 10% reconstituted skim milk supplemented with 0.8% casein acid hydrolysate (Sharlau, Barcelona, Spain). *Escherichia coli* 0157 H⁻ and *Salmonella enteritidis* 4396 were propagated in BHI broth (Scharlau) for 24 h at 37 °C.

2.2 Enzyme activity assays

The enzyme activities were carried out with cell-free extracts obtained from LAB and bifidobacteria strains. Bacterial cells were harvested by centrifugation (10,000 ×g, 15 min, 4 °C) and washed twice with 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5. The harvested cells were resuspended in 500 µl of 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5, then mixed (1:1, w/v) with sterile glass beads (diameter, 150-212 µm) and beaten for mechanical disruption in a FastPrep equipment (Bio101; Savant Instruments, Holbrook, NY, USA). The insoluble fraction and glass beads were removed by centrifugation (12,000 ×g, 10 min, 4 °C) and the supernatant fraction stored at -80 °C until use. Protein content of the cell-free extracts was determined using the Bradford method employing the Bio-Rad (Bio-Rad, Munich, Germany) protein assay and BSA for preparation of standard curve.

The substrates *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside, *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, *o*-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside and *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used to determine the activities α - and β -glucosidases and α - and β -galactosidases, respectively. Standard enzymatic reactions were performed by mixing 900 µl of 1 mM substrate prepared in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5, with 100 µl of cell-free extract (6 mg ml⁻¹) and incubating at 37 °C. The amount of *p*-nitrophenol or *o*-nitrophenol released was

monitored continuously by measuring absorbance at 410 nm in a Shimadzu UV-1601 spectrophotometer with a thermostatic CPS-240 controller (Shimadzu, Kyoto, Japan). Fructofuranosidase activity was performed as Janer et al. (2004), using 0.1% FOS as substrate. Liberated fructose and glucose were determined with a commercial D-glucose/D-fructose determination kit (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), which allows the differentiation of both carbohydrates in a two-step enzymatic reaction. Enzymatic activities were expressed in nmol of *p*-, *o*-nitrophenol or D-fructose released from the substrate per min and mg of protein.

2.3 Organic and short-chain fatty acids (SCFA) analysis

SCFA and organic acids production by LAB and bifidobacteria were measured by following the capillary GC method described by Richardson et al. (1989). For quantitative determinations, 50 µl of a solution of 2-ethylbutyric acid (100 mM in methanol) was added to 0.5 ml of bacteria culture as internal standard (IS). SCFA and organic acids were extracted by the addition of 250 µl concentrated HCl and 1 ml diethyl ether followed by vortexing. After centrifugation (3000 ×g, 10 min) the ether layer was removed and transferred to a GC-microvial, and 10 µl of derivatization reagent (*N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N*-methyl-trifluoroacetamid, MTBSTFA; Fluka Chemie AG, Buch, Switzerland) was added and the mixture heated to 80 °C for 20 min. The reaction mixture was left at room temperature for a further 24 h to ensure complete derivatization. Identification and quantification of SCFA and organic acids in the samples were based on the use of the relative response factors calculated for the target compounds in standard solutions at different concentration levels against the IS (2-ethylbutyric acid). The standard solution mixture was made from pure compounds (formate, 20 mM; acetate, 20 mM; propionate, 10 mM; iso-butyrate, 10 mM; butyrate,

10 mM; valerate, 5 mM; IS, 100 mM; lactate, 15 mM and succinate, 10 mM), all purchased from Sigma–Aldrich, and derivatised in the same way than above. All measurements were made by using a minimum of triplicate samples. SCFA and organic acids were analyzed on a Perkin-Elmer chromatograph (model 8420, Beaconsfield, UK) equipped with a FID detector and were separated using an EQUITY™-1 fused-silica capillary column (60 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 µm film thickness, Supelco, Belafonte, PA, USA). The column was held at 63 °C for 3 min after injection, temperature-programmed at 10 °C min⁻¹ to 110 °C, held there for 0.5 min, and then temperature-programmed at 20 °C min⁻¹ to 270 °C and held there for 15 min. The injector temperature was 300 °C and the detector temperature was 275 °C. Helium was the carrier gas with a column inlet pressure set at 20 psig (138 kPa) at a split ratio of 20:1 and the injection volume was 0.2 µl.

2.4 Caco-2 cell culture and inhibition of pathogen colonization assays.

Caco-2 cells were grown on Men-Alpha Medium (Invitrogen, Barcelona, Spain) supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO₂. Caco-2 cells were seeded in 96-well tissue culture plates (Falcon Microtest TM, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) at 1 × 10⁴ cells per well and grown during 15 days to obtain a monolayer of differentiated and polarized cells.

The inhibition of colonization of *E. coli* 0157 H⁻ and *S. enteritidis* 4396 into Caco-2 cells was evaluated by exclusion, competition and displacement mechanisms using *L. acidophilus* LA-5 in the assays. Bacteria were grown on appropriate media and cells were sedimented by centrifugation (10,000 ×g, for 10 min), washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) buffer pH 7.1 (10 mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, 3 mM KCl) and resuspended in Dulbecco's modified Eagle medium

(DMEM, Invitrogen). In the competition assay, 5×10^6 CFU/well of *L. acidophilus* LA-5 were added simultaneously with 1×10^5 CFU/well of *E. coli* or *S. enteritidis* and incubated for 1 h at 37 °C in atmosphere with 5% CO₂. To test possible exclusion and displacement of pathogens by *L. acidophilus*, the incubation of Caco-2 cells at 37 °C for 1 h with one strain, *L. acidophilus* in the exclusion assay and the pathogen in the displacement assay, was followed by washing off unbound cells and addition of the pathogen or *L. acidophilus* strain followed by 1 h of additional incubation. The exact number of viable *L. acidophilus*, *E. coli* and *S. enteritidis* used in the assays was determined by plate counting on MRS agar for *L. acidophilus* and VRBA (Scharlau) for the pathogens. After incubations, unattached bacteria were removed by 3-fold washing with PBS.

Caco-2 cells were detached from the wells by addition of 0.05% trypsin-EDTA and incubation for 10 min at 37 °C. Then, ice cold sterile PBS was added to each well followed by agitation to dissociate well contents. The bacteria bound to Caco-2 cells were quantified by serial dilutions plated on MRS agar for *L. acidophilus* and VRBA (Scharlau) for the pathogens and incubated at 37 °C. Experimental conditions were repeated at least in triplicate.

2.5 Statistical analysis

Results are expressed as means \pm standard deviation. The one-way analysis of variance (ANOVA) was performed to determine the significance of the effect of carbon sources and bacterial species on enzyme activity and SCFA production. Two-tailed Student's *t* test assuming equal variances was used to compare adhesion of pathogens tested under conditions of competition, exclusion or displacement with the adhesion of

the pathogen alone. All tests were conducted using SPSS version 15.0 and a *P* value below 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

Differences in the fermentative metabolism of *S. thermophilus* STY-31, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBY-27, *L. casei* LC-01, *L. acidophilus* LA-5 and *B. lactis* BB-12 grown on different carbon sources have been studied. Table 1 shows the results of α - and β -glucosidase and α - and β -galactosidase activities of the strains after growing on milk, lactose or FOS. *B. lactis* BB-12 showed all the enzyme activities assayed and it was the only species that exhibited β -glucosidase and α -galactosidase activities. On the other hand, *S. thermophilus* only showed β -galactosidase activity. Although lactose is the main carbohydrate in milk, β -galactosidase activity of all species grown on milk were higher ($P < 0.05$) than on MRS fermentation broth containing lactose as sole carbon source (Table 1). The same trend was observed for the α -galactosidase activity of *B. lactis*. However, α -glucosidase activity of *L. casei*, *L. acidophilus* and *B. lactis* and β -glucosidase activity of *B. lactis* were higher ($P < 0.05$) in cells grown on FOS than on milk. *S. thermophilus* and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* did not grow with FOS as carbon source (Table 2), therefore the activities were not determined in these cultures. Regarding the β -fructofuranosidase activity, it was only detected in *L. casei*, *L. acidophilus* and *B. lactis* that were grown on FOS. The results obtained were 0.47, 1.43 and 0.50 nmol fructose released per min and mg protein, respectively.

The production of organic acids and SCFA during growth of *S. thermophilus* STY-31, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBY-27, *L. casei* LC-01, *L. acidophilus* LA-5 and *B. lactis* BB-12 on glucose, lactose and FOS was also analysed (Table 2). All the

strains grew abundantly on glucose and lactose but *S. thermophilus* and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* were not able to grow on medium with FOS. It was detected the preference of lactose over glucose by *B. lactis* and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Excepting to *B. lactis*, lactate was the main organic acid produced, followed by acetate and formate. *B. lactis* was the only producer of formate using the three carbohydrates (glucose, lactose and FOS). *S. thermophilus* also produced formate on glucose and lactose, whereas *L. casei* only produced formate on FOS. No other organic acid or SCFA were produced during the growth and conditions assayed. Lactate concentration was lower on FOS than on glucose and lactose in all the species excepting to *L. acidophilus*, which showed the highest value ($P < 0.05$) of lactate on FOS among all the strains studied. In agreement with the growth observation, *L. casei*, *L. acidophilus* and *B. lactis* produced acetate using FOS as carbon source although the highest ($P < 0.05$) acetate concentration was obtained by *B. lactis* on the three carbohydrates. Fig. 1 shows acetate and lactate production by LAB and bifidobacteria grown on milk and milk supplemented with 2% FOS. Significant differences ($P < 0.05$) were detected between strains in the organic acid production although there were not significant differences between both growth cultures. Among the strains, *B. lactis* produced the highest amount of acetate ($P < 0.05$) and *L. acidophilus* the highest values of lactate ($P < 0.05$).

Based on our previous results of *L. acidophilus* LA-5 adhesion capability to the Caco-2 cell line (Fernández de Palencia et al., 2008), a study of inhibition to colonization was carried out among *L. acidophilus* and the adhesive enteropathogenic bacteria *S. enteritidis* 4396 and *E. coli* 0157H⁻ for adhesion to Caco-2 cells (Fig. 2). The ability of *L. acidophilus* to displace the enteropathogens from the Caco-2 cell monolayer was evaluated by calculating the percentage of the reduction of the adhered enteropathogen cells in the displacement, exclusion and competition assays compared to

that obtained in assays with solely the enteropathogen. The inhibition of colonization was stronger ($P < 0.05$) in the competition assay than during exclusion and displacement assays. When *L. acidophilus* and *S. enteritidis* or *E. coli* were incubated simultaneously with Caco-2 cells, 54% inhibition of *E. coli* adhesion and 52% inhibition of *S. enteritidis* adhesion were observed. Higher inhibition values of *S. enteritidis* adhesion were observed in displacement assays than in exclusion assays, that is, when Caco-2 cells were pre-incubated with the enteropathogen before addition of *L. acidophilus*.

4. Discussion

The composition of the intestinal microbiota can be modulated by the ingestion of targeted probiotics and/or prebiotics. The modification of intestinal microbiota is aimed at increasing the number of bifidobacteria and LAB and the prevalence of a fermentative microbiota capable of prebiotic digestion. To understand how these bacteria can grow on these carbon sources, knowledge of the carbohydrate-hydrolyse enzymes is needed. In this paper, a screening among LAB and bifidobacteria for their carbohydrase activities has been carried out. The activities were compared based on the growth of the strains on different carbohydrates as sole carbon source. Lactose resulted a better carbohydrate than glucose for growing *B. lactis* and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. It has been described that *Bifidobacterium longum* preferentially uses lactose over glucose as a carbon and energy source, since lactose led to the repression of a glucose-H⁺ symporter gene (Parche et al., 2006). Glucose-nonfermenting *B. lactis* strains have been also reported (Masco et al., 2005; Van der Meulen et al., 2004). In our study, *B. lactis* BB-12 reached the highest counts among all strains assayed when they were grown on FOS (Table 2). *Bifidobacterium* spp. are generally considered the main

target organisms for prebiotic stimulation by inulin-type fructans (Gibson et al., 2004). Besides *B. lactis* BB-12, the strains *L. acidophilus* LA-5 and *L. casei* LC-01 were the only ones that grew on FOS as only carbon source. Also, the three strains only showed β -fructofuranosidase activity when they were grown on FOS as solely carbon source. Functional analyses of the FOS utilization operon in *L. acidophilus* and *L. casei* have demonstrated in these species that the β -fructofuranosidase encoding gene is repressed by glucose (Barrangou et al., 2003; Goh et al., 2007).

Differences in expression of α - and β -galactosidase and α - and β -glucosidase activities depending on the carbon source were described in this study. The increase in α - and β -galactosidase activities when *B. lactis* was grown on milk was already reported in an earlier study (Janer et al., 2005). The highest β -galactosidase activity among all the strains studied was found in *L. acidophilus* LA-5 growing on milk. On the other hand, only *B. lactis* showed β -glucosidase activity and although *Bifidobacterium* spp. are widely recognized for the production of β -glucosidase (Van der Broek et al., 2008), it is surprising that the activity was not detected in *Lactobacillus* spp. (Table 1). A recent study has showed that β -glucosidase activity in *Lactobacillus* spp. strains is mostly associated to the cell-envelope (submitted for publication). In general, the α - and β -glucosidase activities increased in bacteria grown on FOS. The screening for differentially expressed genes of *L. plantarum* WCFS1 has demonstrated a significant up-regulation of the α -glucosidase encoding gene when the strain was grown on FOS compared to glucose (Saulnier et al., 2007).

The increase of organic acids produced by LAB and bifidobacteria grown on milk (Fig.1) compared with their growth on lactose as only carbon source (Table 2) agreed with the higher expression of β -galactosidase activity in the strains assayed (Table 1). The only organic acids produced by LAB and bifidobacteria grown on

glucose, lactose and FOS were lactate, acetate and formate. Lactate and acetate were the major metabolites produced by LAB and *B. lactis*, respectively, when grown on the carbohydrates under study. However, a significant ($P < 0.05$) difference in the metabolite production pattern was observed in *L. casei* growing on FOS compared to glucose and lactose (Table 2). A metabolic shift toward more acetate and formate production, at the expense of lactate production, was observed during *L. casei* growth on FOS. The metabolic shift has been also described in *Bifidobacterium* spp. grown on FOS (Falony et al., 2009) and it has been associated with more ATP production, resulting in a more efficient use of the available energy source (Van der Meulen et al., 2004).

A study of resistance to colonization against *E. coli* and *S. enteritidis* was carried out with *L. acidophilus* LA-5. The strain had demonstrated the highest adhesion capacity to Caco-2 cell line within the strains assayed in this study (Fernández de Palencia et al., 2008) and the production of an inducible bacteriocin (Tabasco et al., 2009). Besides these competition characteristics, *L. acidophilus* LA-5 has shown in this study the highest production of lactate when grown on FOS as sole carbon source (Table 2) and on milk (Fig. 1). Lactate is considered a key antimicrobial compound produced by lactobacilli (Servin, 2004). Our results show that *L. acidophilus* is effective in reducing *E. coli* and *S. enteritidis* adhesion to enterocytes in Caco-2 cell line and that the incubation of *L. acidophilus* LA-5 together with enteropathogenic species (competition assay) was the most effective. Medellín-Peña and Griffiths (2009) reported that *L. acidophilus* LA-5 produces heat-stable small molecules, possibly of proteinaceous nature, that are active against enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 attachment to intestinal epithelial cells. The molecule(s) reduced the transcription of enteropathogen genes involved in colonization and quorums sensing. A combined

318 action of lactate, which acts as a permeabilizer of the Gram-negative bacterial outer
319 membrane (Alakomi et al., 2000), and lactacin B produced by *L. acidophilus* LA-5
320 (Tabasco et al., 2009) could account for the inhibition of enteropathogen adhesion.

321 This study shows the potential benefits of adding FOS to fermented milk based
322 on its utilization by probiotic strains of the species *L. acidophilus*, *L. casei* and *B. lactis*,
323 and the increase in fructofuranosidase, galactosidase and glucosidase activities and
324 organic acids production. In addition, *L. acidophilus* LA-5 has demonstrated properties
325 involving resistance to colonization against the intestinal pathogens *E. coli* and *S.*
326 *enteritidis*.

327 328 **Acknowledgements**

329 This work was funded by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación
330 (grants: AGL2004-07285-C02-01, AGL2006-12100 and Consolider FUN-C-FOD
331 CSD2007-063) and Comunidad Autónoma de Madrid (ALIBIRD: S-0505/AGR-0153).
332 The authors are grateful to Cristina Quevedo and Irene Bustos for their valuable
333 technical assistance.

References

- Alakomi, H.L., Skytta, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, Latva-Kala, K., Helander, I.M., 2000. Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2001–2005.
- Barrangou, R., Altermann, E., Hutkins, R., Cano, R., Klaenhammer, T.R., 2003. Functional and comparative genomic analyses of and operon involved in fructooligosaccharide utilization by *Lactobacillus acidophilus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8957–8962.
- Barrangou, R., Azcarate-Peril, M.A., Duong, T., Conners, S., Kelly, R.M., Klaenhammer, T.R., 2006. Global analysis of carbohydrate utilization by *Lactobacillus acidophilus* using cDNA microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 3816–3821.
- Falagas, M.E., Betsi, G.I., Athanasiou, S., 2007. Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 13, 657–664.
- Falony, G., Lazidou, K., Verschaeren, A., Weckx, S., Maes, D., De Vuyst, L., 2009. In vitro kinetic analysis of fermentation of prebiotic inulin-type fructans by *Bifidobacterium* species reveals four different phenotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 454–461.
- Fernández de Palencia, P., López, P., Corbí, A.L., Peláez, C., Requena, T., 2008. Probiotic strains: survival under simulated gastrointestinal conditions, in vitro adhesion to Caco-2 cells effect on cytokine secretion. *Eur. Food. Res. Technol.* 227, 1475–1484.
- Gibson, G.R., Probert, H.M., Van Loo, J., Rastall, R.A., Roberfroid, M.B., 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* 17, 259–275.

360 Gillor, O., Etzion, A., Riley, M.A., 2008. The dual role of bacteriocins as anti- and
 361 probiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 591–606.

362 Goh, Y.J., Lee, J.H., Hutkins, R.W., 2007. Functional analysis of the
 363 fructooligosaccharide utilization operon in *Lactobacillus paracasei* 1195. *Appl.*
 364 *Environ. Microbiol.* 73, 5716–5724.

365 Goh, Y.J., Zhang, C., Benson, A.K., Schlegel, V., Lee, J.H., Hutkins, R.W., 2006.
 366 Identification of a putative operon involved in fructooligosaccharide utilization by
 367 *Lactobacillus paracasei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7518–7530.

368 Gueimonde, M., Delgado, S., Mayo, B., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., De los
 369 Reyes-Gavilán, C.G., 2004. Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and
 370 *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. *Food Res.*
 371 *Int.* 37, 839–850.

372 Janer, C., Arigoni, F., Lee, B.H., Peláez, C., Requena, T., 2005. Enzymatic ability of
 373 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* to hydrolyze milk proteins: identification and
 374 characterization of endopeptidase O. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8460–8465.

375 Janer, C., Rohr, L.M., Peláez, C., Laloi, M., Cleusix, V., Requena, T., Meile, L., 2004.
 376 Hydrolysis of oligofructoses by the recombinant β -fructofuranosidase from
 377 *Bifidobacterium lactis*. *System. Appl. Microbiol.* 27, 279–285.

378 Makras, L., De Vuyst, L., 2006. The in vitro inhibition of Gram-negative pathogenic
 379 bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. *Int. Dairy J.*
 380 16, 1049–1057.

381 Makras, L., Triantafyllou, V., Fayol-Messaoudi, D., Adrian, T., Zoumpopoulou, G.,
 382 Tsakalidou, E., Servin, A., De Vuyst, L., 2006. Kinetic analysis of the antibacterial
 383 activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

384 reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. Res. Microbiol. 157,
 385 241–247.

386 Maldonado Galdeano, C., de Moreno de LeBlanc A., Vinderola, G., Bibas Bonet, M.E.,
 387 Perdígón, G., 2007. Proposed model: Mechanisms of immunomodulation induced
 388 by probiotic bacteria. Clin. Vaccine Immunol. 14, 485–492.

389 Masco, L., Huys, G., De Brandt, E., Temmerman, R., Swings, J., 2005. Culture-
 390 dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products
 391 claimed to contain bifidobacteria. Int. J. Food Microbiol. 102, 221–230.

392 Medellín-Peña, M.J., Griffiths, M.W., 2009. Effect of molecules secreted by
 393 *Lactobacillus acidophilus* strain La-5 on *Escherichia coli* O157:H7 colonization.
 394 Appl. Environ. Microbiol. 75, 1165–1172.

395 Parche, S., Belet, M., Rezzonico, E., Jacobs, D., Arigoni, F., Titgemeyer, F., Jankovic,
 396 I., 2006. Lactose-over-glucose preference in *Bifidobacterium longum* NCC2705:
 397 glcP, encoding a glucose transporter, is subject to lactose repression. J. Bacteriol.
 398 188, 1260–1265.

399 Richardson, A.J., Calder, A.G., Sewart, C.S., Smith, A., 1989. Simultaneous
 400 determination of volatile and non-volatile acidic fermentation products of anaerobes
 401 by capillary gas chromatography. Lett. Appl. Microbiol. 9, 5–8.

402 Saulnier, D.M.A., Molenaar, D., De Vos, W.M., Gibson, G.R., Kolida, S., 2007.
 403 Identification of prebiotic fructooligosaccharide metabolism in *Lactobacillus*
 404 *plantarum* WCFS1 through microarrays. Appl. Environ. Microbiol. 73, 1753–1765.

405 Servin, A.L., 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against
 406 microbial pathogens. FEMS Microbiol. Rev. 28, 405–440.

- Shene, C., Mardones, M., Zamora, P., Bravo, S., 2005. Kinetics of *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 fermentations: effect of the dilution rate and carbon source. Appl. Microbiol. Biotechnol. 67, 623–630.
- Tabasco, R., García-Cayuela, T., Peláez, C., Requena, T., 2009. *Lactobacillus acidophilus* La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria. Int. J. Food Microbiol. 132, 109–116.
- Tabasco, R., Paarup, T., Janer, C., Peláez, C., Requena, T., 2007. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. Int. Dairy J. 17, 1107–1114.
- Van der Broek, L.A.M., Hinz, S.W., Beldman, G., Vincken, J.P., Voragen, A.G.J., 2008. *Bifidobacterium* carbohydrases-their role in breakdown and synthesis of (potential) prebiotics. Mol. Nutr. Food Res. 52, 146–163.
- Van der Meulen, R., Avonts, L., De Vuyst, L., 2004. Short fractions of oligofructose are preferentially metabolized by *Bifidobacterium animalis* DN-173 010. Appl. Environ. Microbiol. 70, 1923–1930.
- Van der Meulen, R., Makras, L., Verbrugghe, K., Adrian, T., De Vuyst, L., 2006. In vitro kinetic analysis of oligofructose consumption by *Bacteroides* and *Bifidobacterium* spp. indicates different degradation mechanisms. Appl. Environ. Microbiol. 72, 1006–1012.
- Velraeds, M.M.C., Van de Belt-Gritter, B., Busscher, H.J., Reid, G., Van der Mei, H.C., 2000. Inhibition of uropathogenic biofilm growth on silicone rubber in human urine by lactobacilli - a teleologic approach. World J. Urol. 18, 422–426.

431 **Table 1**

432 α -, β -Glucosidase and α -, β -galactosidase activities in *S. thermophilus* STY-31, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBY-27, *L. casei* LC-01, *L.*
433 *acidophilus* LA-5 and *B. lactis* BB-12 grown on milk and MRS fermentation broth supplemented with 2 % (w/v) lactose or FOS. Mean values
434 and standard deviation are expresses as nmol nitrophenol released per min and mg protein.

Species	α -Glucosidase			β -Glucosidase			α -Galactosidase			β -Galactosidase		
	Milk	Lactose	FOS	Milk	Lactose	FOS	Milk	Lactose	FOS	Milk	Lactose	FOS
<i>S. thermophilus</i>	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND	437.1(47.4) ^a	273.9(39.2) ^b	ND
<i>L. bulgaricus</i>	8.9(1.9) ^a	ND	ND	–	–	ND	–	–	ND	417.4(41.7) ^a	207.3(25.4) ^b	ND
<i>L. casei</i>	2.9(0.1) ^a	4.8(0.5) ^b	5.7(1.2) ^b	–	–	–	–	–	–	39.2(0.2) ^a	0.5(0.1) ^b	0.5(0.2) ^b
<i>L. acidophilus</i>	0.4(0.0) ^a	0.3(0.1) ^a	7.0(1.2) ^b	–	–	–	–	–	–	635.1(184.8) ^a	505.1(128.5) ^a	127.6(30.7) ^b
<i>B. lactis</i>	3.0(0.2) ^a	11.1(2.9) ^b	5.8(0.7) ^c	0.5(0.1) ^a	0.5(0.2) ^a	1.2(0.5) ^b	1.8(0.7) ^a	0.8(0.2) ^b	0.6(0.1) ^b	321.2(94.4) ^a	178.7(32.6) ^b	285.5(19.1) ^a

435 Values of each enzyme activity in the same row with the same superscript letter are not significantly different ($P > 0.05$); –, not detected; ND, not
436

437 determined.

438

439 **Table 2**

440 Growth (cfu ml⁻¹) and organic acids (formate, acetate and lactate) produced by *S. thermophilus* STY-31, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBY-
 441 27, *L. casei* LC-01, *L. acidophilus* LA-5 and *B. lactis* BB-12 after incubation in MRS fermentation broth supplemented with 2 % (w/v) of
 442 glucose, lactose or FOS. Mean values and standard deviation of organic acids are expressed as mM.

Species	Glucose				Lactose				FOS			
	cfu ml ⁻¹	Formate	Acetate	Lactate	cfu ml ⁻¹	Formate	Acetate	Lactate	cfu ml ⁻¹	Formate	Acetate	Lactate
<i>S. thermophilus</i>	1.2×10 ⁹	3.5(1.0)	3.4(1.2)	59.2(10.1)	2.0×10 ⁹	2.6(0.7)	3.1(2.3)	46.0(10.4)	2.2×10 ⁷	–	–	7.9(1.7)*
<i>L. bulgaricus</i>	2.3×10 ⁸	–	–	55.1(8.8)	8.7×10 ⁸	–	–	58.9(7.5)	3.0×10 ⁷	–	–	10.1(1.4)*
<i>L. casei</i>	2.5×10 ⁹	–	6.6(4.0)	80.0(7.6)	2.4×10 ⁹	–	8.2(2.9)	79.0(12.2)	5.4×10 ⁸	6.8(2.0)	9.8(3.6)	17.2(2.7)*
<i>L. acidophilus</i>	2.0×10 ⁸	–	9.5(4.8)	70.6(15.7)	2.3×10 ⁸	–	8.3(1.1)	68.7(9.4)	1.5×10 ⁸	–	5.6(2.5)	70.0(9.8)
<i>B. lactis</i>	8.4×10 ⁸	7.7(3.5)	35.5(17.6)	16.2(3.4)	2.0×10 ⁹	6.1(3.1)	35.3(4.2)	12.2(2.4)	9.1×10 ⁸	5.7(0.8)	21.6(7.4)	9.7(1.5)*

443 *Indicates lactate production on FOS was significantly different ($P < 0.05$) than lactate produced on glucose or lactose; –, not detected

LEGENDS TO FIGURES

Fig. 1. Acetate and lactate concentrations (mM) produced by *S. thermophilus* STY-31 (white bars), *L. casei* LC-01 (spotted bars), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBY-27 (grey bars), *L. acidophilus* LA-5 (black bars) and *B. lactis* BB-12 (stripped bars) on milk and milk supplemented with 2% (w/v) FOS after 24h of anaerobic incubation at 37 °C. Asterisks (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) indicate the organic acid means which were significantly different between species.

Fig. 2. Percentage of inhibition of *E. coli* 0157H⁻ (black bars) and *Salmonella enteritidis* 4396 (white bars) adhesion to Caco-2 cells by *L. acidophilus* LA-5, under conditions simulating exclusion, displacement and competition. Statistical analysis was performed with Student's *t* test. Asterisks (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) indicate the means which were significantly different from the control, i.e. data for adhesion of *E. coli* and *S. enteritidis* alone.

Figure 1

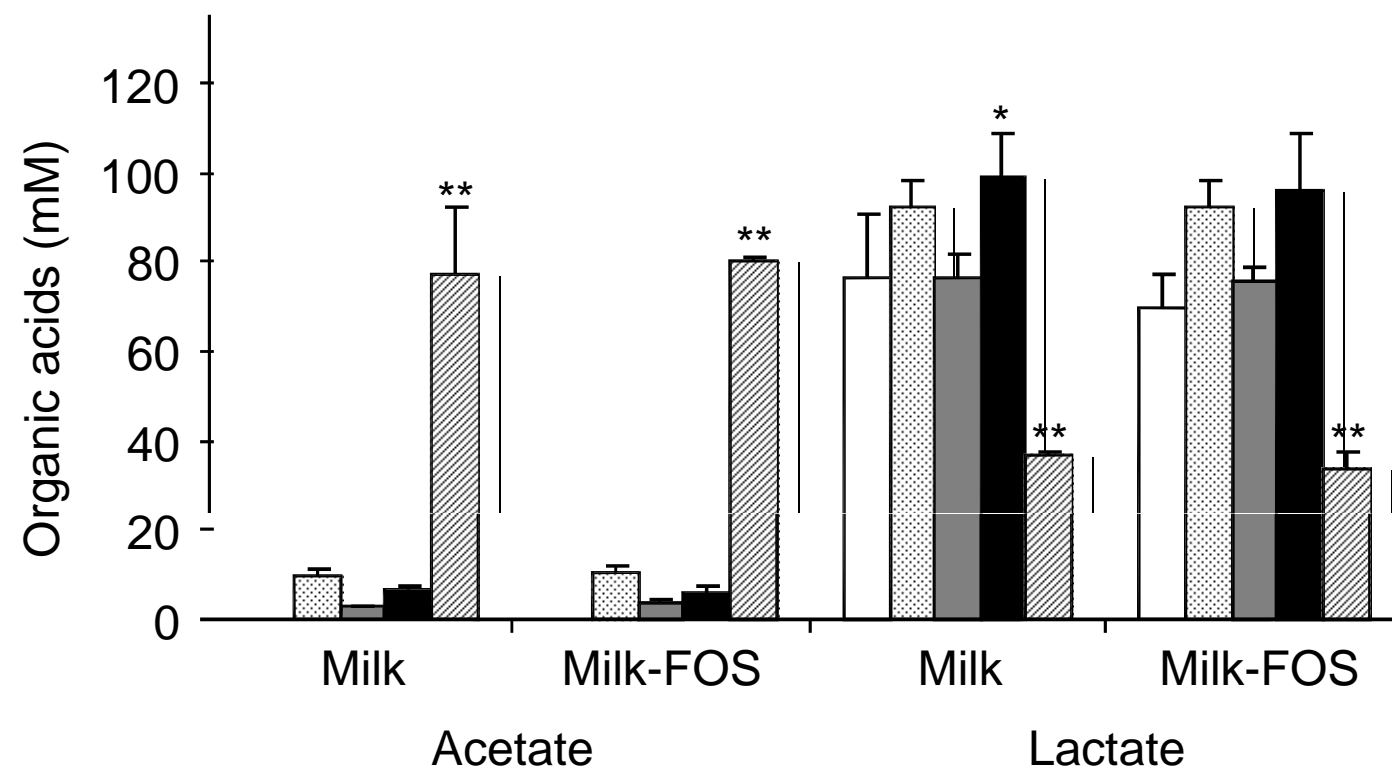


Fig.1

Figure 2

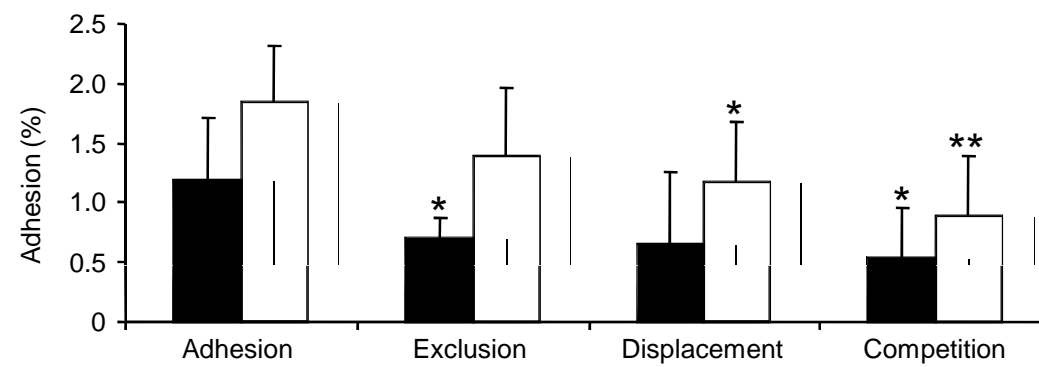


Fig.2.

VIII. EFECTO EN LA MICROBIOTA INTESTINAL DE LAS BACTERIAS PROBIÓTICAS CONTENIDAS EN LECHE FERMENTADA EMPLEADAS PARA LA PREVENCIÓN DE LA DIARREA ASOCIADA A ANTIBIÓTICOS

Manuscrito en preparación

**Effects on intestinal microbiota of probiotic fermented milk
used for prevention of antibiotic-associated diarrhoea**

Tabasco, R.¹, Velasco, M.², Delgado-Iribarren, A.², Guijarro, C.², Fontecha, J.¹, Peláez, C.¹, Requena, T.^{1,*}

¹*Department of Dairy Science and Technology, Instituto del Frío (CSIC), José Antonio Novais 10, 28040 Madrid, Spain*

²*Hospital Universitario Fundación Alcorcón, 28922 Alcorcón, Spain*

*Corresponding author. Tel.: +34915492300; fax: +34915493627.

E-mail address: trequena@if.csic.es (Teresa Requena)

Abstract

Probiotic administration could prevent antibiotic-associated diarrhoea (AAD) due to the restoration of an intestinal microbiota imbalance caused by antibiotics. In the present study, we have analysed the effect of the probiotics *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* LC-01 and *Bifidobacterium lactis* Bb-12 on the composition and metabolic activities of the intestinal microbiota in human subjects during and after antibiotic treatment. Stool samples were analysed for faecal microbiota enumeration, probiotic species detection and quantification, enzyme activities, and organic acids and SCFA concentrations. The most predominant bacterial groups in probiotic and placebo groups were total anaerobes, followed by bacteroides and total aerobes. Enumeration of probiotic species in faecal samples by real-time PCR indicated no significant changes during the intervention study (*L. casei* and *B. lactis* counts were within the range of 6–8 log cfu/g). Enzyme activities and SCFA concentrations showed a large inter-individual variability over the time in the placebo and probiotic groups, except to β -galactosidase activity, which was the most abundant in both groups over the time. In conclusion, the combination of *L. acidophilus* LA-5, *L. casei* LC-01 and *B. lactis* Bb-12 taken in daily doses of 10^9 – 10^{10} cfu does not reduce the rate of occurrence of diarrhoea in adult patients taking amoxicillin/clavulanate or levofloxacin.

Keywords: Probiotics, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium lactis*, antibiotic-associated diarrhoea

1. Introduction

Antibiotic-associated diarrhoea (AAD) usually occurs in 5–35% of patients taking antibiotics and varies depending upon the specific type of antibiotic, the health of the host and exposure to pathogens (McFarland, 2008). It is estimated that *Clostridium difficile* is responsible for 25%-33% of reported AAD and nearly all occurrences of pseudomembranous colitis (Dubberke and Wertheimer, 2009). In general, broad-spectrum antibiotics such as ampicillin, amoxicillin-clavulanate, clindamycin, and cephalosporins are associated with a high risk of AAD. The mechanism of AAD is presumably related to alterations of the intestinal microbiota by antibiotics, which causes disruption of colonization resistance and which consequently results in opportunistic pathogen overgrowth or metabolic imbalances. The colonization resistance involves the production of antimicrobial substances by intestinal microbiota, e.g. bacteriocins, organic and short chain fatty acids (SCFA), competition for adhesion receptors, overall nutrient limitations, etc. (Stecher and Hardt, 2008).

Probiotics are defined as live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit in the host (FAO/WHO, 2002). The rationale behind probiotic administration to prevent AAD is to restore an intestinal microbiota imbalance caused by antibiotics. Several probiotic strains have been used in controlled studies to prevent AAD, and the beneficial effects of probiotics seem to be strains-specific. The most recent published meta-analysis for AAD (McFarland, 2006), including 25 randomized controlled trials, showed that a beneficial effect could be attributed to *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus rhamnosus* GG, and multispecies probiotic mixtures (Kotowska et al., 2005; Mehmet et al., 2006). It has been suggested that probiotics are more effective in preventing AAD in children than adults (Rohde et al., 2009). Overall, it is difficult to generalize on probiotic efficacy at preventing AAD

since properties that apply to one strain should not be generalized to the species. Besides, the effects of probiotics on diarrhoea prevention have been assessed mainly in small size ($n < 100$) clinical studies (de Vrese and Marteau, 2007).

Most studies on probiotics and AAD have been addressed to the clinical development of diarrhoea and only in a few studies the composition of the faecal microbiota or its metabolic activity (bacterial enzymes, organic acids, SCFA, etc.) have been assessed during and after the antibiotic treatment (Orrhage et al., 2000; Plummer et al., 2005; Koning et al., 2008). Furthermore, as far as we know, there are no published studies where faecal samples were analyzed for the probiotic content. Different molecular techniques using total microbiota DNA have been developed to detect and identify microorganisms from complex microbial ecosystems without the necessity of being cultured. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rRNA gene amplicons has allowed the detection of bacterial species and changes in community structure (Zoetendal et al., 1998). Complementary to qualitative changes explored by the PCR-DGGE method, the quantitative real-time PCR technique offers the possibility of analyzing the quantitative of specific members of the microbial community (Carey et al., 2007).

We have carried out a large (314 patients) scale randomized double blinded placebo-controlled clinical trial to evaluate the effect of a multispecies probiotic fermented milk for the prevention of AAD (Velasco et al., 2008). The study resulted in that the probiotics *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* LC-01 and *Bifidobacterium lactis* Bb-12 did not have effect in the prevention of AAD in adults. In the present study we have analysed the effect of these probiotics on the composition and metabolic activities of the intestinal microbiota in human subjects during and after the antibiotic treatment.

2. Materials and methods

2.1. Subjects and study design

The clinical study was executed according to a parallel, randomized, placebo-controlled, double-blind design. The study involved 314 adult subjects (aged > 18) who were placed on antibiotic therapy (amoxiciline/clavulanic or levofloxacin). Participants gave written informed consent and the study was approved by the medical ethics committee of the Fundación Hospital Alcorcón, Spain. Subjects (n=306) were randomly assigned to receive a multispecies probiotic fermented milk (n=122) or a comparable placebo (n=125). The probiotic fermented milk contained (colony-forming units, cfu/ml) *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (5×10^6), *Lactobacillus casei* subsp. *casei* LC-01 (1×10^7) and *Bifidobacterium lactis* Bb-12 (1×10^8) as probiotics, and *Streptococcus thermophilus* STY-31 (2×10^9) and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBY-27 (5×10^6) as starter strains for milk fermentation. The placebo fermented milk contained the starter strains (cfu/ml) *S. thermophilus* STY-31 (1×10^9) and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBY-27 (1×10^8). Both products were manufactured by La Priégola (Madrid, Spain) and they had a similar taste and external appearance. Viable counts of the species were carried out in both products to ensure strain viability through the study (Tabasco et al., 2007).

The intervention study began within 48 h of starting antibiotic therapy. Patients were asked to drink the probiotic or placebo fermented milk (200 ml/day) during antibiotic treatment (10 days) and continued doing so for 5 days. Stool samples were collected at the recruitment into the study (period 1), after 2-3 days of probiotic or placebo fermented milk drinking (period 2), at the end of antibiotic treatment (period 3), and after not drinking for one week the probiotic or placebo fermented milk (period 4).

2.2. Preparation of stool samples

Faecal samples from patients that did drink the placebo or probiotic fermented milk were frozen immediately after collection and stored at -80°C in screw-capped plastic tubes. A sample of 3 g of frozen faeces was scraped into a sterile plastic tube with a sterile spatula and homogenized with nine volumes of buffered peptone water (Scharlau) with 1ml/l of Tween 80 (Scharlau) and 0.5 g/l of L-cysteine hydrochloride. Serial decimal dilutions of the homogenized faecal sample were prepared immediately for bacterial enumeration and the remainder was frozen at -80°C for the following analyses of quantitative real-time PCR, enzyme activities, and organic acids and SCFA concentrations.

2.3. Microbiological analyses

Serial decimal dilutions of the homogenized faecal sample were made in buffered peptone water with Tween 80 and cysteine as in the sample preparation. The following culture media and incubation conditions were used (incubations at 37°C for 3 days unless otherwise stated): Columbia blood agar for total aerobes and Wilkins–Chalgren agar for total anaerobes, LAMVAB agar (Hartemink et al., 19997) for lactobacilli; MRS agar with 50 mg L^{-1} mupirocin (Simpson et al., 2004) for bifidobacteria; bile esculin agar for bacteroides; Reinforced Clostridial agar (Oxoid) agar with 0.05 g/l neomycin sulfate and Egg's Yolk Sterile Emulsion (Oxoid) for *C. difficile*; McConkey agar for *Enterobacteriaceae*; Bile Esculin Azide Agar (Scharlau) for enterococci. Anaerobes, lactobacilli, bifidobacteria, bacteroides and *C. difficile* agar plates were incubated in anaerobic jars (Gas-pack, Anaerogen; Oxoid) and aerobes, enterobacteria and enterococci agar plates were incubated aerobically for 48 h.

2.4. Biochemical analyses

The homogenized faecal sample was thawed and centrifuged at $14,000 \times g$ for 10 min at 4 °C. The fecal supernatant was analyzed for SCFA and organic acids and the pellet was used for enzyme activities assays and total DNA extraction.

SCFA and organics acids were measured by a modification of the capillary GC method of Richardson et al. (1989) as described by Tabasco et al. (2009b). SCFA and organic acids were derivatized with *N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N*-methyl-trifluoroacetamid and analyzed on a Perkin-Elmer chromatograph (model 8420, Beaconsfield, UK) equipped with a FID detector. The compounds were separated using an EQUITYTM-1 fused-silica capillary column (60 m \times 0.25 mm i.d. \times 0.25 μ m film thickness, Supelco, Belafonte, PA, USA). All measurements were made by using a minimum of triplicate samples and SCFA and organic acids were expressed as mmol per g of faecal sample.

For enzyme assays, the pellet from 10 ml of the homogenized faecal sample was washed twice with 50 mM potassium phosphate buffer, pH 6.5, and disrupted with glass beads (diameter, 150-212 μ m) and beaten for mechanical disruption in a FastPrep equipment (Bio101; Savant Instruments, Holbrook, NY, USA). Supernatant was recovered by centrifugation at $14,000 \times g$ for 10 min and then analyzed for α - and β -glucosidases, α - and β -galactosidases, and β -glucuronidase activities, as previously described by Tabasco et al. (2009b). For β -glucuronidase activity the substrate *p*-nitrophenyl- β -D-glucuronide (Sigma) was used. Reactions were stopped on ice by adding NaOH 0.1 M and the activities were expressed as μ mol per g of fecal sample. For nitroreductase and azoreductase activities, the faecal pellet was suspended in 5 mM glucose-50 mM potassium phosphate buffer, pH 6.5, added with 3 mM *p*-nitrobenzoic acid and 60 mM Amaranth, respectively, and incubated anaerobically at 37 °C for 24 h,

as described by Nakamura et al. (2002). Nitroreductase activity was measured by following the production of *p*-aminobenzoic acid at 540 nm and azoreductase activity was measured by monitoring at 520 nm the reduction of Amaranth.

2.5. DNA isolation and quantification of target bacterial DNA in faecal samples by real-time PCR

Total DNA from faecal samples was extracted using the QIAamp DNA kit (QIAGEN, Hilden, Germany) with some modifications. The homogenized fecal sample was centrifuged at $14,000 \times g$ for 10 min and the pellet was washed in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5. The bacterial cells were broken using glass beads and the FastPrep equipment as described above. Glass beads and cell debris were removed by centrifugation and the purification of DNA was performed according to the manufacturer's instructions. The isolated DNA was stored at -20 °C until the analyses.

Standard curves for quantitative real-time PCR were prepared for *L. acidophilus* LA-5, *L. casei* subsp. *casei* LC-01, and *B. lactis* Bb-12. The standard curves were made by spiking 10-fold serial dilutions of each strain pure culture into a faecal sample that showed no amplification for the target bacteria and by isolating total DNA as described before. The species-specific primers used in this study were previously described (Tabasco et al., 2007; Tabasco et al., 2009a) and are based on the 16S rRNA gene for *L. casei* subsp. *casei*, the transaldolase gene for *B. lactis* and the lactacin B structural gene for *L. acidophilus*. The efficiency of the selected primers for quantifying bacterial DNA by RTi-PCR obtained in each amplification cycle was checked by developing curves with serially diluted 10-fold DNA obtained from pure cultures of each strain. The quantification by RTi-PCR was performed with the iQTM5 Multicolor Real-Time PCR detection system Cyclor (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) with the conditions reported

by García Cayuela et al. (2009). At the end of each PCR run, melting curve analysis was performed from 60 to 95 °C (0.5 °C/s) for detecting non-specific PCR product and primer-dimer co-amplification. The C_T values were used to quantify the cells (cfu/g) in the faecal samples by extrapolation from the standard curve obtained for each species with known amounts of bacteria. All real-time PCR reactions were performed in triplicate.

PCR-DGGE was performed to confirm the specificity of real-time PCR to quantify *L. casei* subsp. *casei* and *B. lactis* in faecal samples. Primers and PCR-DGGE conditions were previously described (Tabasco et al., 2007). Briefly, samples were separated by using a 9% polyacrylamide gel with a 40–60% gradient of 7 M urea and 40% formamide that increased in the electrophoresis running direction. Electrophoresis was carried out with a DCode system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Representative faecal samples, showing high *L. casei* subsp. *casei* and/or *B. lactis* counts by real-time PCR, were also analyzed by pour-plate counts into selective agar media (Tabasco et al., 2007). Characteristic colonies (20%) were checked by species-specific PCR and the amplicons were sequenced at the DNA Sequence Service of the Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC (Madrid, Spain).

2.6. Statistical analysis

Statistical analyses were done by using the SPSS version 15.0 statistics package (SPSS, Chicago, IL, USA). The independent-sample Student *t*- test was applied to compare bacterial counts from placebo and probiotic groups. The non parametric *Mann-Whitney U* test was used to compare faecal SCFA and enzyme activities values from both groups. Within a group, ANOVA (*Tukey* test) was used to analyze statistically differences along the different periods. *P* values of < 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Faecal microbiota enumeration and detection of probiotic strains

The composition of faecal microbiota from patients was studied and it resulted similar at the baseline period for the probiotic and placebo groups (Table 1). Overall, the most predominant bacterial populations were total anaerobes, followed by bacteroides and total aerobes. Comparing placebo and probiotic groups, we observed higher counts ($P < 0.05$) of bacteroides and enterobacteria in the placebo group than in the probiotic group at the end of antibiotic treatment (period 3) (Table 1). In the probiotic group, the total anaerobes counts decreased ($P < 0.05$) throughout the intervention study and they were lower than in the placebo group. No further differences in other bacterial genera were observed between the probiotic and the placebo group neither over time within a group.

Faeces of patients who were given the probiotic fermented milk were analyzed for detection and enumeration of the probiotic strains by RTi-PCR. The quantification limit was 10^3 cfu/g faeces for *B. lactis* and *L. acidophilus* and 10^5 cfu/g faeces for *L. casei*. Standard curves and selected samples showing high counts for *L. casei* and *B. lactis* were checked by PCR-DGGE to unravel formation of unspecific amplicons. The results showed in the positive samples separation of distinguishable products corresponding with the pattern of pure strain cultures (results not shown). Samples showing high counts of *B. lactis* and *L. casei* by RT-PCR were also plated on selective media (Tabasco et al., 2007) and 20% of the colonies in the highest dilution were analysed for the transaldolase and the 16S rRNA gene sequence, respectively. The results of the sequences confirmed the accuracy of the species-specific RTi-PCR for the two species.

Fig.1 shows the prevalence and counts of *B. lactis*, *L. acidophilus* and *L. casei* enumerated by specific RTi-PCR during the intervention study. *B. lactis* and *L. casei*

were the most predominant probiotic bacteria over the time in the range of 6–8 log cfu/g, except in period 4 (wash out period) where *L. casei* was not detected. However, the inter-individual variations were considerably high and resulted in no significant differences in the probiotic bacteria detection or enumeration during the periods analyzed (Fig.1).

3.2. Metabolic activities in faeces

Enzyme activities and SCFA were determined at the four periods in faecal samples from all the subjects (Table 2 and 3). Large interindividual variability was found over the time in the placebo and probiotic groups in results of enzyme activities and SCFA concentrations. Among the seven bacterial enzyme activities investigated (Table 2), the β -galactosidase activity was the most abundant in both groups over the time. Similarly to enzyme activities, the large inter-individual and inter-group variability in SCFA concentrations resulted in no significant modification of the SCFA profile due to the probiotic fermented milk consumption, except to an increase ($P < 0.05$) in the acetic and lactic acid concentration in the probiotic group respect to the placebo group in samples collected during period 2 (Table 3).

4. Discussion

The randomized double blinded placebo-controlled clinical trial carried out to evaluate the effect of *L. acidophilus* LA-5, *L. casei* LC-01 and *B. lactis* Bb-12 delivered in a fermented milk drink for the prevention of AAD resulted in no reduction of the occurrence rate of diarrhoea in adult patients taking amoxicillin/clavulanate or levofloxacin. (Velasco et al., 2008). However, the probiotic counts in the fermented

milk drink reached values of 10^7 – 10^8 cfu/ml (Tabasco et al., 2007), which were higher than the minimum value of 10^6 cfu/ml suggested by the Codex Alimentarius (Codex, 2003).

Disturbance of the normal gut microbiota due to antibiotics is related to the development of AAD either by reduction of microbiota able to ferment diet polysaccharides (e.g. *Bifidobacteria* and *Bacteroides*) or by decrease of bile acids metabolism performed by dehydroxylating bacteria (e.g. *Clostridium* and *Eubacterium*) (Gorkiewicz, 2009). In the present study, there was not identified any bacterial group that was significantly altered during the antibiotic treatment in both groups, apart from a significant decrease of total anaerobes in the probiotic group. Wide interindividual response and resilience of the dominant human intestinal microbiota upon short-course antibiotic challenge (De La Cochetière et al., 2005) could be associated to the obtained results. In addition, *Enterobacteriaceae* and *Bacteroides* were significantly lower in the probiotic group than in the placebo group at the end of the antibiotic treatment (period 3) but returned to similar values at the end of the study (wash out period). However, these changes did not affect significantly the rates of diarrhoea among the groups.

The assumption that *L. acidophilus* LA-5, *L. casei* LC-01 and *B. lactis* Bb-12 do not prevent AAD could be based on the lack of effectiveness of the strains or that the daily dose of 10^9 cfu of lactobacilli or 10^{10} cfu of *B. lactis* were insufficient to cause an effect, provided that the strains viability is reduced during gastrointestinal transit (Fernández de Palencia et al., 2008) and that the strains were sensitive to the antibiotics used (results not shown). Enumeration in faecal samples of probiotic species used in the fermented milk drink indicated no significant changes during the intervention study (when detected, *L. casei* and *B. lactis* counts by RTi-PCR were within the range of 6–8 log cfu/g). Strains *L. acidophilus* LA-5 and *B. lactis* BB-12 supplied in a fermented

milk drink were evaluated by Wenus et al. (2008) for the prevention of AAD in adults, resulting in positive beneficial effects despite that the study was completed with only 63 patients. The fermented milk contained similar probiotic doses to those in our study but included the strain *L. rhamnosus* GG. The strain GG has been demonstrated to prevent diarrhoea preferably in children and its effect is dose-dependent, being generally greater with doses more than 10^{10} – 10^{11} cfu (Guarino et al., 2009). Thomas et al. (2001) carried out a randomized, placebo-controlled trial to assay the effect of *Lactobacillus* GG on AAD. The conclusion was that *Lactobacillus* GG in a dose of 10^{10} cfu/day did not reduce the rate of occurrence of diarrhoea in the sample of 267 adult patients taking antibiotics initially administered in the hospital setting. On the other hand, there are several studies that did find a significant protective effect of *Saccharomyces boulardii* in the prevention of AAD in adults (McFarland, 2006).

Changes in faecal metabolic activity related to intake of the probiotic strains *L. acidophilus* LA-5, *L. casei* LC-01 and *B. lactis* Bb-12 could not be clearly differentiated between the probiotic and placebo groups, either. Individual variations in intestinal microbiota could be responsible for inconsistent differences found in SCFA concentrations and enzyme activities (Tables 2 and 3). The main fermentation products of the bacteria added to the probiotic fermented drink were lactate, acetate and formate (Tabasco et al., 2009b). However, the higher content of acetate and lactate after 2-3 days of probiotic fermented milk drinking (period 2) was not consistent with higher counts of the probiotic strains (Fig. 1). Woodmansey et al. (2004) reported the effect of antibiotic therapy on the organic acid concentration in elderly people and they observed significant decreases in propionate, butyrate, isobutyrate and valerate, in comparison to levels for health elderly people. Most of the clinical studies available which report beneficial properties of probiotics in AAD are based only in clinical observations

(Beausoleil et al., 2007; Hickson et al., 2007; Ruszczynski et al., 2008) and did not investigate the composition of the faecal microbiota during and after treatment and/or the mechanisms of the probiotics effect.

In conclusion, the effect of probiotics on DAA seems to be dependent on the age of patients, the strain(s) of probiotics used and the dose of viable microorganisms. The combination of *L. acidophilus* LA-5, *L. casei* LC-01 and *B. lactis* Bb-12 taken in daily doses of 10^9 – 10^{10} cfu does not reduce the rate of occurrence of diarrhoea in adult patients (over 70 years) taking amoxicillin/clavulanate or levofloxacin.

Acknowledgments

This work was funded by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (grants: AGL2004-07285-C02-01, AGL2006-12100 and Consolider FUN-C-FOD CSD2007-063) and Comunidad Autónoma de Madrid (ALIBIRD: S-0505/AGR-0153). The authors are grateful to Cristina Quevedo and Irene Bustos for their valuable technical assistance.

References

- Beausoleil, M., Fortier, N., Guenette, S., L'Ecuyer, A., Savoie, M., Franco, M., Lachaine, J., Weiss, K. **2007**. Effect of a fermented milk combining *Lactobacillus acidophilus* CL1285 and *Lactobacillus casei* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Can. J. Gastroenterol.* 21: 732-736.
- Carey C.M, Kirk, J.L., Ojha, S., Kostrzynska, M. **2007**. Current and future uses of real-time polymerase chain reaction and microarrays in the study of intestinal microbiota, and probiotic use and effectiveness. *Can J Microbiol.* 53:537-550.
- CODEX Alimentarius Commission. **2003**. *CODEX standard for fermented milks*. Codex Stan 243-2003. http://www.codexalimentarius.net/download/standards/400/CXS_243e.pdf.
- De Vrese, M. Marteau, P. R. **2007**. Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea. *J Nutr.* 137: 803S-11S.
- Dubberke, E.R., Wertheimer, A.I. **2002**. Review of current literature on the economic burden of *Clostridium difficile* infection. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 30:57-66.
- FAO/WHO **2002** Guidelines for the evaluation of probiotics in food. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.
- Fernández de Palencia, P., López, P., Corbí, A.L., Peláez, C., Requena, T. **2008**. Probiotic strains: survival under simulated gastrointestinal conditions, in vitro adhesion to Caco-2 cells effect on cytokine secretion. *Eur. Food. Res. Technol.* 227:1475–1484.

352 García-Cayuela, T., Tabasco, R., Peláez, C., Requena, T. **2009**. Simultaneous detection
353 and quantification of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented
354 milks by using propidium monoazide and real time PCR. *Int. Dairy J.* 19:405-
355 409.

356 Gorkiewicz, G. **2009**. Nosocomial and antibiotic-associated diarrhoea caused by
357 organisms other than *Clostridium difficile*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 33: S37-
358 41.

359 Guarino, A. Lo Vecchio, A. Canani, R. B. **2009**. Probiotics as prevention and treatment
360 for diarrhea. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 25: 18-23.

361 Hickson, M, D'souza, A. L., Muthu, N, Rogers, T.R., Want, S., Rajkumar, C., Bulpitt,
362 C.J. **2007** Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea
363 associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial.
364 *BMJ.* 335:80-83.

365 Koning, C.J., Jonkers, D.M., Stobberingh, E.E., Mulder, L., Rombouts, F.M.,
366 Stockbrügger, R.W. **2008**. The effect of a multispecies probiotic on the intestinal
367 microbiota and bowel movements in healthy volunteers taking the antibiotic
368 amoxicillin. *Am. J. Gastroenterol.* 103:178-89.

369 Kotowska, M. Albrecht, P. Szajewska, H. **2005**. *Saccharomyces boulardii* in the
370 prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children: a randomized double-
371 blind placebo-controlled trial. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 21: 583-90.

372 McFarland, L.V. **2008**. Antibiotic-associated diarrhea: epidemiology, trends and
373 treatment. *Future Microbiol.* 3:563-78)

374 McFarland, L. V. **2006**. Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic
375 associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. *Am. J.*
376 *Gastroenterol.* 101:812-822.

377 Mehmet, C., Bulent, B., Ismail, A., Murat, B.C., Alaadin, P. **2006**. Prophylactic
378 *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a
379 prospective study. Med. Sci. Monit. 12:119-122.

380 Nakamura, J. Kubota, Y. Miyaoka, M. Saitoh, T. Mizuno, F. Benno, Y. **2002**.
381 Comparison of four microbial enzymes in Clostridia and Bacteroides isolated
382 from human feces. Microbiol. Immunol. 46: 487-90.

383 Orrhage, K., Sjöstedt, S., Nord, C.E. **2000**. Effect of supplements with lactic acid
384 bacteria and oligofructose on the intestinal microflora during administration of
385 cefpodoxime proxetil. J. Antimicrob. Chemother. 46:603-611.

386 Plummer, S.F., Garaiova, I., Sarvotham, T., Cottrell, S.L., Le Scouiller, S., Weaver,
387 M.A., Tang, J., Dee, P., Hunter, J. **2005**. Effects of probiotics on the composition
388 of the intestinal microbiota following antibiotic therapy. Int. J. Antimicrob.
389 Agents. 26:69-74.

390 Richardson, A.J., Calder, A.G., Sewart, C.S., Smith, A., **1989**. Simultaneous
391 determination of volatile and non-volatile acidic fermentation products of
392 anaerobes by capillary gas chromatography. Lett. Appl. Microbiol. 9: 5–8.

393 Rohde, C.L., Bartolini, V., Jones, N. **2009**. The use of probiotics in the prevention and
394 treatment of antibiotic-associated diarrhea with special interest in *Clostridium*
395 *difficile*-associated diarrhea. Nutr. Clin. Pract. 24:33-40.

396 Ruszczynski, M. Radzikowski, A. Szajewska, H. **2008**. Clinical trial: effectiveness of
397 *Lactobacillus rhamnosus* (strains E/N, Oxy and Pen) in the prevention of
398 antibiotic-associated diarrhoea in children. Aliment. Pharmacol. Ther. 28: 154-
399 61.

400 Stecher, B., Hardt, W.D. **2008**. The role of microbiota in infectious disease. Trends.
401 Microbiol. 16:107-114.

402 Tabasco, R., Fernández de Palencia, P., Fontecha, J., Peláez, C., Requena, T. **2009b**.
 403 Fermentative metabolismo of lactic acid bacteria and bifidobacteria. Inhibition
 404 of enteropathogens colonization by *Lactobacillus acidophilus*. Food Microbiol.
 405 (submitted).

406 Tabasco, R., García-Cayuela, T., Peláez, C., Requena, T., **2009a**. *Lactobacillus*
 407 *acidophilus* La-5 increases lactacin B production when it senses live target
 408 bacteria. Int. J. Food Microbiol. 132, 109–116.

409 Tabasco, R., Paarup, T., Janer, C., Peláez, C., Requena, T., **2007**. Selective enumeration
 410 and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*,
 411 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp.
 412 *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. Int. Dairy J. 17:1107–
 413 1114.

414 Thomas, M. R., Litin, S. C., Osmon, D. R., Corr, A. P., Weaver, A. L., Lohse, C. M.
 415 **2001**. Lack of effect of *Lactobacillus* GG on antibiotic-associated diarrhea: a
 416 randomized, placebo-controlled trial. Mayo Clin. Proc. 76:883-9.

417 Velasco, M., Guijarro, C., Requena, T., Pelaez, C., Delgado-Iribarren, A., Mateos, M.
 418 A., Castilla, V. **2008**. Probiotics in the prophylaxis of antibiotic-associated
 419 diarrhea: a randomized double-blinded controlled trial. ICAAC/IDSA 46th
 420 Annual Meeting, Washington, DC, EEUU.

421 Wenus, C., Goll, R., Loken, E.B., Biong, A.S., Halvorsen, D.S., Florholmen, J. **2008**.
 422 Prevention of antibiotic-associated diarrhoea by a fermented probiotic milk
 423 drink. European J. Clin. Nutr. 62:299-301.

424 Woodmansey, E. J., McMurdo, M. E., Macfarlane, G. T., Macfarlane, S. **2004**.
 425 Comparison of compositions and metabolic activities of fecal microbiotas in

426 young adults and in antibiotic-treated and non-antibiotic-treated elderly subjects.
427 Appl. Environ. Microbiol. 70:6113-22.
428 Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D., De Vos, W. M. **1998**. Temperature gradient gel
429 electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable
430 and host-specific communities of active bacteria. Appl. Environ. Microbiol.
431 64:3854-9.
432

LEGEND TO FIGURE

Fig. 1. Prevalence (%) and counts (log cfu equivalents/g faeces) analysed by real-time PCR of probiotic species in faecal samples from patients in the probiotic group. Prevalence: *B. lactis* (white bars), *L. acidophilus* (black bars) and *L. casei* (stripped bars). Counts (log cfu equivalents/g faeces): *B. lactis* (●), *L. acidophilus* (▲) and *L. casei* (■). Period refers to stool samples collected at the recruitment into the study (period 1), after 2-3 days of probiotic or placebo fermented milk drinking (period 2), at the end of antibiotic treatment (period 3), and after not drinking for one week the probiotic or placebo fermented milk (period 4).

Table 1. Microbiota counts (mean and range values in log cfu/g faeces) in faecal samples from patients in the probiotic and placebo group.

	Placebo group				Probiotic group			
Period	1	2	3	4	1	2	3	4
<i>n</i>	25	19	18	11	22	26	20	14
Aerobes	6.9 (5.0-8.8)	7.0 (5.3-9.3)	6.5 (4.5-8.8)	6.8 (5.0-9.4)	7.2 (4.6-9.3)	6.6 (4.0-9.5)	6.8 (4.3-9.2)	6.2 (5.0-8.9)
Enterobacteria *	5.7 (3.5-7.8)	5.4 (3.3-8.1)	5.8 (3.0-8.5)	5.3 (3.5-7.1)	5.5 (3.0-8.1)	5.0 (3.0-6.8)	4.6 (3.0-7.0)	5.0 (3.8-6.6)
<i>Enterococcus</i>	6.1 (4.0-8.7)	6.5 (4.0-9.1)	5.4 (4.0-7.3)	6.2 (4.3-8.6)	6.3 (3.9-8.8)	6.5 (4.0-9.1)	6.2 (4.3-8.8)	5.4 (4.0-8.1)
Anaerobes *	8.3 (6.8-9.7)	8.2 (7.0-9.7)	8.1 (6.6-9.5)	8.3 (6.4-10.1)	8.4 (5.9-9.6) ^a	7.6 (5.3-9.6) ^b	7.8 (6.2-9.2) ^{a,b}	7.5 (5.5-9.1) ^b
Bifidobacteria	6.7 (3.9-8.5)	6.0 (3.3-8.1)	6.6 (4.7-8.6)	6.9 (3.3-8.5)	6.5 (4.0-8.6)	5.7 (3.3-8.5)	5.7 (3.3-8.1)	5.4 (3.0-8.6)
<i>Lactobacillus</i>	6.1 (3.0-7.8)	5.7 (3.5-7.8)	5.9 (3.3-7.8)	6.0 (4.4-8.4)	5.8 (3.0-7.9)	4.9 (3.0-8.6)	5.1 (3.0-8.0)	4.8 (3.0-8.1)
<i>Bacteroides</i> *	7.0 (5.0-9.5)	7.1 (4.3-9.3)	7.4 (5.2-9.2)	6.9 (5.0-9.2)	7.0 (4.6-9.0)	6.4 (4.0-8.3)	6.5 (5.1-8.3)	7.0 (5.7-8.0)

^{a, b} Values with different letters in the probiotic group are significantly different ($P < 0.05$) with the *Tukey* test.

* Differences between placebo and probiotic groups. Enterobacteria in period 3 ($P = 0.05$); Anaerobes in period 2 ($P = 0.04$); Bacteroides in period 3 ($P = 0.02$).

Table 2. Bacterial enzyme activities (mean and range values in $\mu\text{mol/g}$ faeces) in faecal samples from patients in the probiotic and placebo group.

	Placebo group				Probiotic group			
Period	1	2	3	4	1	2	3	4
<i>n</i>	24	13	13	9	22	15	17	12
β -Glucosidase*	30.1 (0.0-316.3)	23.5 (0.0-89.4)	36.7 (0.0-85.6)	54.5 (0.0-145.0)	12.7 (0.0-78.7) ^a	26.0 (0.1-153.8) ^a	9.2 (0.0-39.7) ^a	82.7 (2.7-363.4) ^b
α -Glucosidase*	86.1 (1.9-617.2)	102.7 (3.6-386.9)	129.8 (6.5-788.8)	145.6 (2.1-712.6)	25.5 (0.0-143.2)	125.4 (0.1-665.1)	59.3 (0.0-387.2)	141.9 (18.3-576.2)
β -Galactosidase	572.9 (1.6-2252.8)	1084.0 (0.0-6092.8)	605.4 (11.9-2363.1)	462.5 (34.0-1117.6)	304.1 (0.0-1205.0)	336.4 (0.0-1165.1)	495.8 (8.8-2710.4)	445.8 (9.9-3165.8)
α -Galactosidase	220.3 (0.0-1268.3)	131.1 (9.8-381.9)	147.1 (0.0-443.4)	140.4 (30.6-609.1)	84.0 (1.2-343.3)	258.5 (0.0-1359.6)	65.5 (5.0-427.2)	197.0 (19.9-1077.1)
β -Glucuronidase	33.1 (0.0-105.6)	42.0 (1.4-159.7)	46.8 (0.0-183.5)	63.5 (0.4-308.4)	35.2 (0.4-128.2)	46.3 (0.9-223.0)	28.0 (0.5-102.6)	58.7 (3.4-438.5)
Nitroreductase *	0.4 (0.0-1.9)	0.6 (0.0-2.2)	0.9 (0.0-3.1)	0.9 (0.0-2.4)	0.2 (0.0-0.7)	1.4 (0.0-4.0)	1.3 (0.0-4.4)	0.4 (0.0-3.4)
Azoreductase	0.8 (0.0-2.8)	0.4 (0.0-2.1)	0.9 (0.0-4.0)	1.3 (0.0-3.1)	0.8 (0.1-1.3)	0.6 (0.0-2.3)	1.2 (0.0-6.2)	1.7 (0.0-3.5)

* Differences between placebo and probiotic groups were significant ($P < 0.05$) evaluated with the *Mann-Whitney* test. β - glu ($P = 0.05$), α - glu ($P = 0.01$) in period 1; β - glu ($P = 0.004$) in period 3; nitroreductase ($P = 0.03$) in period 4.

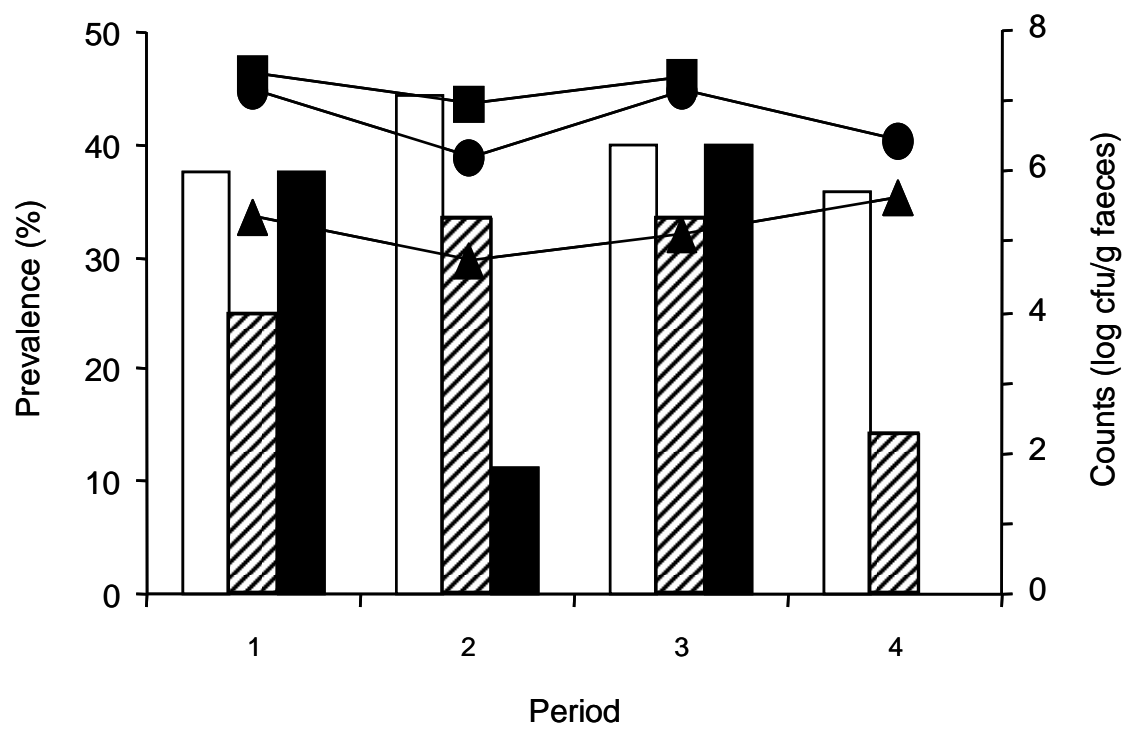
^{a, b} Values with different letters in the probiotic group are significantly different ($P < 0.05$) evaluated with the *Tukey* test.

Table 3. Concentration of SCFA (mean and range values in mmol/g) in faecal samples from patients in the probiotic and placebo group

	Placebo group				Probiotic group			
Period	1	2	3	4	1	2	3	4
<i>n</i>	18	9	9	7	10	9	9	6
Formic acid	0.7 (0.0-2.0)	5.8 (0.0-37.3)	1.3 (0.0-3.4)	0.8 (0.0-2.1)	0.9 (0.0-4.5)	2.8 (0.0-18.9)	1.0 (0.5-1.8)	0.9 (0.4-1.2)
Acetic acid *	1.0 (0.0-4.1)	0.3 (0.0-2.2)	3.5 (0.0-27.4)	0.9 (0.0-2.9)	3.0 (0.0-9.5)	1.1 (0.1-4.3)	1.8 (0.1-5.8)	2.6 (0.4-5.7)
Propionic acid	0.6 (0.0-3.6)	1.6 (0.0-13.9)	2.2 (0.0-13.6)	1.5 (0.0-7.0)	1.3 (0.0-5.0)	2.9 (0.0-20.0)	0.3 (0.0-1.1)	0.6 (0.0-1.8)
Isobutyric	1.4 (0.0-1.4)	0.1 (0.0-0.5)	0.2 (0.0-1.2)	0.1 (0.0-0.4)	0.1 (0.0-0.2)	0.4 (0.0-1.7)	0.1 (0.0-0.4)	0.1 (0.0-0.3)
Butyric	2.0 (0.0-15.9)	0.4 (0.0-1.7)	1.7 (0.0-8.6)	0.4 (0.0-2.1)	1.0 (0.0-3.8)	0.5 (0.0-1.8)	0.3 (0.0-1.3)	0.5 (0.0-1.2)
Valeric acid	0.1 (0.0-0.7)	0.1 (0.0-0.5)	0.1 (0.0-0.6)	0.1 (0.0-0.6)	0.3 (0.0-2.0)	0.2 (0.0-1.0)	0.1 (0.0-0.3)	0.2 (0.0-0.5)
Lactic acid *	0.7 (0.0-2.8)	0.1 (0.0-0.5)	2.0 (0.0-17.6)	0.2 (0.0-1.2)	1.8 (0.0-6.6)	0.5 (0.0-1.3)	0.1 (0.0-0.2)	0.1 (0.0-0.2)

* Acetic acid and lactic acid were significantly different between placebo and probiotic groups ($P= 0.04$) in period 2.

Fig. 1



IX. DISCUSIÓN GENERAL

IX.1. Viabilidad e identificación de bacterias probióticas

Según la Norma Española de Calidad para el yogur (BOE, 2003), los únicos microorganismos aceptados como cultivo iniciador para la obtención de este producto son *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. El recuento mínimo de la suma de los microorganismos del yogur debe ser de 10^7 ufc/g. El término leche fermentada incluye, por tanto, los productos lácteos obtenidos a partir de una tecnología equivalente a la de fabricación del yogur, pero que emplean además o en sustitución de los del yogur otros microorganismos, los cuales pertenecen habitualmente a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. El Codex alimentario recomienda que el recuento de estos microorganismos sea como mínimo de 10^6 ufc/g en el momento de su consumo (CODEX Alimentarius Comisión, 2003). Por lo tanto, es de gran importancia controlar la viabilidad de las especies que componen el producto durante su almacenamiento y hasta el momento de su consumo, pudiendo establecer un periodo de caducidad conforme a la dosis mínima de bacterias recomendadas. Otro aspecto importante es la comprobación de la autenticidad de las especies probióticas declaradas en la etiqueta del producto.

Existe una Norma Internacional ISO/IDF (ISO, 2002) para la cuantificación de las bacterias del yogur, que establece las condiciones para la cuantificación de estos microorganismos. Esta Norma se basa en una técnica de recuento de colonias de *S. thermophilus* en agar M-17 adicionado con lactosa, después de su incubación en aerobiosis a 37 °C durante 48 h. Para *L. bulgaricus*, se establece el recuento de colonias en agar MRS, con glucosa y acidificado a pH 5,4, después de su incubación en anaerobiosis a 37 °C durante 72 h. En relación a la cuantificación de otros tipos de microorganismos presentes en leches fermentadas en mezcla con los microorganismos del yogur, no existen normas internacionales o métodos de referencia, aunque existen grupos de trabajo que actualmente llevan a cabo estudios para el desarrollo de dichas normas oficiales. En el mismo sentido, existen en la literatura científica diferentes estudios que analizan la posible diferenciación y cuantificación de diferentes especies de bacterias añadidas a las leches fermentadas, fundamentalmente *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium* spp. (Darukaradhy et al., 2006). En general, los medios propuestos basan su selectividad en la adición de diferentes antibióticos, aunque pueden conducir a la subestimación de la población bacteriana en

estudio y comprometer la valoración de la calidad del producto ensayado y/o de su potencial beneficio probiótico (Roy, 2001).

Durante el periodo de realización de esta Tesis, hemos llevado a cabo un estudio dirigido a la cuantificación selectiva y diferencial de cuatro especies de bacterias lácticas y de *Bifidobacterium lactis* en cultivos mixtos presentes en leche fermentada. La novedad del procedimiento respecto a los existentes es que permite distinguir simultáneamente *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. debrueckii* subsp. *bulgaricus* entre sí y frente a otra bacteria láctica como es *S. thermophilus* y a *B. lactis*, todo ello basado en el empleo de diferentes condiciones de incubación, utilización de carbohidratos y/o en la diferenciación por morfología de las colonias, pero sin la adición de antibióticos a los medios de cultivo. Para la cuantificación de *S. thermophilus*, la incubación en aerobiosis a 45 °C durante 24 h en agar M17-lactosa fue selectiva frente al resto de las bacterias de la leche fermentada por las siguientes condiciones: *L. casei* crece a 37 °C pero no a 45 °C, *L. bulgaricus* y *B. lactis* no crecen en aerobiosis y *L. acidophilus* no es capaz de crecer en 24 h de incubación, aunque sí a las 48 h. Para la cuantificación de *L. bulgaricus*, el medio MRS acidificado recomendado por la Norma ISO/FDIS 7889 IDF 117 (ISO, 2002) permitía el crecimiento también de *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. bulgaricus*. En nuestro caso, se empleó fructosa en vez de glucosa e incubación a 45 °C, condiciones selectivas frente a *B. lactis* y a *L. casei*, respectivamente. El método mostró ser diferencial para *L. bulgaricus* y *L. acidophilus*, obteniendo colonias lenticulares para *L. bulgaricus* y rugosas correspondientes a *L. acidophilus*. El método basado en el medio MRS adicionado de maltosa e incubación en atmósfera de CO₂ ya fue descrito por Martín-Diana *et al.* (2003) para la cuantificación selectiva de *L. acidophilus* frente a *S. thermophilus* y *B. lactis* en leche fermentada. En nuestro caso, también se ha demostrado que es selectivo contra *L. bulgaricus* y diferencial frente a *L. casei*, ya que las colonias obtenidas por *L. acidophilus* (estrelladas) y *L. casei* (redondas) son claramente diferenciables. Además, cuando se compararon los recuentos obtenidos para *L. acidophilus* en MRS-maltosa y en MRS-fructosa, los resultados fueron equivalentes en ambos métodos. Por último, para *B. lactis*, el método selectivo que desarrollamos consistió en el empleo de rafinosa en lugar de glucosa, la adición de cloruro de litio (0,05%) para evitar el crecimiento de los lactobacilos, y la incubación en anaerobiosis a 45 °C durante 48-72 h.

Los resultados estadísticos del estudio mostraron que no había diferencias significativas de recuentos entre los métodos propuestos y el crecimiento en condiciones

óptimas de las cepas estudiadas. La mayor desviación estándar se observó en *L. bulgaricus*, donde los recuentos con el método selectivo fueron mayores que con los de referencia. Este mayor recuento puede deberse, probablemente, al mejor crecimiento de *L. bulgaricus* a 45 °C que a 37 °C, incremento de temperatura que también ha sido recomendado por una Norma ISO (ISO, 2002).

Para confirmar la identidad de las colonias obtenidas en los medios propuestos, se empleó la técnica de la PCR con cebadores específicos para cada especie, que fueron diseñados en regiones variables del gen 16S rRNA de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* y *L. casei*. Los cebadores específicos para *B. lactis* fueron diseñados en base a las regiones variables del gen de la transaldolasa (Requena *et al.*, 2002). Tras la confirmación de la amplificación de un solo producto del tamaño esperado para cada especie, se seleccionó un 10% de las colonias obtenidas en cada medio de cultivo selectivo para su identificación. Todas las supuestas colonias analizadas de cada medio selectivo y diferencial confirmaron su identidad por la obtención de los productos de tamaño esperado en la PCR específica, lo que da lugar a un método de identificación rápido y efectivo. Una de las limitaciones de la PCR específica es que requiere el previo aislamiento de cada especie en colonias, ya que los productos de amplificación que se obtienen por PCR son de tamaño similar entre las cinco especies (oscilan entre 116 a 232 pares de bases). Para identificar las especies contenidas en la leche fermentada sin su previo aislamiento, se utilizó la técnica PCR y posterior separación de los productos amplificados por electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE). La técnica de PCR-DGGE ha sido empleada anteriormente por varios autores para la identificación de bifidobacterias y lactobacilos en productos probióticos comerciales (Fasoli *et al.*, 2003; Temmermann *et al.*, 2003). El fundamento de la técnica se basa en la separación de los productos amplificados por diferencias en la secuencia nucleotídica, además de por el tamaño del producto. Para la detección e identificación de las cinco especies contenidas en la leche fermentada comercial, se preparó un estándar de productos específicos obtenido de la mezcla de cada uno de los fragmentos correspondientes de la amplificación del DNA puro de cada especie. Este marcador permitió la posterior identificación de las bandas separadas por DGGE y obtenidas a partir de la amplificación del DNA total de la leche fermentada con cada pareja de cebadores específicos. La ventaja de este método radica en que es capaz de realizar en una sola reacción la identificación conjunta de los cultivos mixtos presentes en leches fermentadas sin su previo aislamiento.

Una de las técnicas más empleadas para la detección y cuantificación directa de bacterias en muestras complejas es la PCR a tiempo real (RTi-PCR). Su principal inconveniente radica en la imposibilidad de diferenciar entre bacterias vivas y muertas debido a que el DNA de estas últimas permanece inalterable y, por lo tanto, es amplificable (Justé *et al.*, 2008). Recientemente, la utilización de agentes intercalantes de DNA que impiden su amplificación ha revolucionado las técnicas moleculares de RTi-PCR al permitir una detección cuantitativa y diferencial de bacterias viables frente a no viables. Entre los diferentes agentes intercalantes de DNA, se ha demostrado que la monoazida de propidio (PMA) tiene una mayor eficacia en la cuantificación de células viables de cultivos puros mixtos (Nocker *et al.*, 2006; Pan y Breidt, 2007; Vesper *et al.*, 2008). La monoazida de etidio (EMA) también se ha empleado en diferentes trabajos como agente discriminante de bacterias dañadas, pero estudios recientes cuestionan su uso ya que también puede penetrar en células intactas de algunas especies bacterianas, como *E. coli*, *Campylobacter jejuni* y *Listeria monocytogenes* (Nocker *et al.*, 2006; Flekna *et al.*, 2007; Cawthorn y Witthuhn, 2008). Para cumplir con el objetivo de analizar la viabilidad de las bacterias probióticas en leche fermentada, desarrollamos un procedimiento basado en la combinación de PMA con RTi-PCR, utilizando SYBR Green como emisor de fluorescencia y los cebadores específicos previamente diseñados por Tabasco *et al.* (2007). La eficiencia de la amplificación para cada pareja de cebadores fue mayor de 0,90, lo que indica que los resultados obtenidos con esos cebadores son exactos y reproducibles. La construcción de las rectas de calibrado para *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* y *B. lactis* se realizó mezclando cantidades conocidas de células viables con células inactivadas por calor, a diferencia de la mayoría de trabajos en los que se realiza diluyendo el DNA de las células viables. Los límites de cuantificación obtenidos fueron de 1×10^3 ufc/g o ml para *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* y *B. lactis*, y 1×10^4 ufc/g o ml para *S. thermophilus* y *L. casei*. Estos límites de cuantificación obtenidos están por debajo del recuento mínimo exigible para los microorganismos que componen las leches fermentadas (Codex, 2003), con lo cual el método desarrollado en esta Tesis permitiría la detección de las bacterias presentes en cualquier tipo de leche fermentada comercial.

Se llevó a cabo el análisis de la viabilidad de las bacterias presentes en leche fermentada que contenía las especies *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* y *B. lactis* a lo largo de su vida útil y uno y dos meses después de su caducidad mediante el método de RTi-PCR asociada a PMA y se comparó con la

viabilidad obtenida en los medios selectivos descritos anteriormente. Los resultados obtenidos con ambos métodos mostraron que la viabilidad fue aceptable para todas las especies durante los 28 días de vida útil del producto y sólo se vio comprometida después de la fecha de caducidad. Dicha pérdida de viabilidad fue detectada de igual manera empleando el procedimiento de recuento en placa que mediante el de cuantificación por RTi-PCR. Para las especies *S. thermophilus*, *L. casei* y *B. lactis*, los niveles de viabilidad prácticamente se mantuvieron durante todo el periodo de estudio. En cambio, para *L. acidophilus* y *L. bulgaricus* la viabilidad empezó a descender a partir de la fecha de caducidad, llegando a reducciones de 3 unidades logarítmicas para ambas especies al cabo de un mes de almacenamiento. Diversos autores han estudiado la viabilidad de probióticos en leche fermentada y yogur durante el periodo de vida útil (Moayednia *et al.*, 2009). Hekmat *et al.* (2009) observaron una gran pérdida de la viabilidad de *L. reuteri* RC-14 (más de 4 unidades logarítmicas) en leche después de un mes de conservación en refrigeración.

Recientemente, Nocker y Camper (2009) han publicado un trabajo sobre la detección de células viables con agentes intercalantes basándose en el concepto de actividad metabólica de la célula en vez de la integridad de membrana. Se ha postulado que existen diferentes estados de viabilidad entre una célula viva y muerta, siendo la desintegración de la membrana la forma más extrema de la pérdida de la viabilidad. Por ejemplo, existen células muertas e inactivas pero con la membrana intacta que, por lo tanto, son impermeables al PMA y sobreestimarían los resultados obtenidos. El empleo de compuestos de actividad lábil (ALC, *activity-labile compound*) basados en la estructura del PMA permiten la detección de sólo aquellas células con un metabolismo activo, ya que en presencia de una actividad enzimática el enlace que une el grupo azida con la molécula se rompería, dejándola así inactiva e imposibilitando que se intercale al DNA. Por el contrario, las células sin actividad enzimática permitirían el paso de la molécula y la unión de ésta con el DNA de la célula, lo que impediría su amplificación por PCR. Este tipo de compuestos podrían ser beneficiosos también para amplificar selectivamente ácidos nucleicos de aquellas células que tienen actividades metabólicas de interés. En definitiva, los ALC podrían mejorar el PMA, ya que evitarían detectar aquellas células muertas e inactivas pero que tengan la membrana intacta. Sin embargo, hacen falta más trabajos para conseguir una optimización de los ALC, ya que los trabajos que existen son preliminares, y por el contrario, el empleo del PMA se encuentra publicado en diversos estudios para la identificación de bacterias viables en

cultivos puros (Nocker y Camper, 2006; Nocker *et al.*, 2006; Pan y Breidt, 2007; Flekna *et al.*, 2007). Recientemente se ha aplicado PMA a muestras complejas, como el trabajo de Bae y Wuertz (2009), en el que el empleo de RTi-PCR asociado a PMA ha logrado diferenciar entre células viables e inviables de *Bacteroidales* en muestras fecales y en muestras de aguas residuales.

La identificación de nuevos aislamientos pertenecientes a especies de bacterias lácticas puede abordarse empleando un amplio abanico de técnicas, tanto fenotípicas como moleculares (apartado II.4.2.). La elección de una técnica u otra dependerá de varios factores como pueden ser el grado de identificación que se desea conseguir (a nivel de especie, género o cepa), el número de muestras a analizar, e incluso el presupuesto económico del que se dispone para llevar a cabo la técnica. La identificación fenotípica resulta todavía esencial cuando se pretende caracterizar un gran número de bacterias presentes en diferentes muestras y cuando los medios de los que se disponen no son los más avanzados. Por eso, encontramos diferentes trabajos de investigación basados en el aislamiento e identificación fenotípica de bacterias lácticas de productos fermentados tradicionales, procedentes fundamentalmente de países no desarrollados. Recientemente se ha publicado un trabajo de identificación de bacterias lácticas de un producto lácteo fermentado de Mongolia en el que, a través de pruebas fenotípicas basadas en la diferente fermentación de carbohidratos y otras pruebas bioquímicas, han logrado la caracterización de la microbiota del producto (Wu *et al.*, 2009). Además, en estos países debido a la fabricación de los productos fermentados de manera tradicional, existe una mayor diversidad microbiana tanto a nivel de especies como de cepas. Uno de los trabajos que ha dado lugar a esta Tesis consistió en el estudio de la capacidad antimicrobiana de las bacterias lácticas aisladas de productos lácteos de Nigeria contra cepas uropatógenas. Para identificar las bacterias lácticas y las cepas uropatógenas se emplearon la tinción de Gram, pruebas bioquímicas y antimicrobianas. En aquellas cepas de bacterias lácticas con capacidad antimicrobiana, se realizó la identificación con la técnica de ARDRA para la agrupación de cepas por especies y la posterior identificación molecular mediante secuenciación del gen 16S rRNA. Este trabajo ha supuesto una novedad en la comparación de diferentes métodos de identificación, algunos de ellos genéticos, empleados en África para la identificación de bacterias uropatógenas. La precisión y exactitud en la identificación de este tipo de bacterias es primordial para la correcta prescripción de antibióticos, ya que existe en

estos países un gran número de antibióticos inefectivos por la falta de estandarización de los métodos de identificación de los microorganismos causantes de la infección.

En definitiva, el empleo de diferentes técnicas de identificación de bacterias lácticas, ya sean técnicas tradicionales o moleculares, han permitido en diferentes trabajos de esta Tesis conseguir un mismo objetivo, que era conocer la identidad (detección) y la viabilidad de las especies presentes en productos lácteos.

El desarrollo de nuevos medios de cultivo selectivos y diferenciales ha permitido la cuantificación específica de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei* y *B. lactis*, contenidas en leche fermentada. Se ha empleado la técnica de RTi-PCR asociada a PMA para cuantificar las células viables contenidas en el producto sin el aislamiento previo en medios de cultivo y, por lo tanto, se han obtenido los resultados de detección, identificación y cuantificación con mayor rapidez. También se ha logrado la caracterización molecular de las cepas probióticas *L. acidophilus* LA-5, *L. casei* LC-01 y *B. lactis* Bb-12 empleando la técnica de PCR -DGGE, lo cual facilitará su posterior identificación en el tracto intestinal.

IX.2. Mecanismos de competencia de las bacterias probióticas

Uno de los mecanismos por los que los probióticos benefician la salud humana es el llamado efecto barrera o antagonismo frente a patógenos, entendido como la resistencia a la colonización en el tracto gastrointestinal (TGI) (Stecher y Hardt, 2008). Esta resistencia a la colonización comprende: (a) la **prevención** de la adhesión de las bacterias enteropatógenas a los enterocitos; (b) la **competencia** con patógenos exógenos por los nutrientes y los sitios de adhesión; (c) la **inhibición** del crecimiento de bacterias patógenas mediante la producción de sustancias antimicrobianas como bacteriocinas, ácidos orgánicos y SCFA (Candela *et al.*, 2005).

En esta Tesis se planteó el objetivo de determinar la capacidad de las cepas probióticas *L. acidophilus* LA-5, *L. casei* LC-01 y *B. lactis* Bb-12 de colonizar el intestino, analizando su aptitud para acceder, implantarse y competir en el TGI. La capacidad de estas cepas probióticas para sobrevivir las condiciones del TGI fue estudiada por Fernández de Palencia *et al.* (2008). Los resultados habían mostrado que entre un 53-91% de las células sobrevivían al estrés gástrico, dependiendo de la cepa y del pH, y que entre un 12 a un 23% de esas bacterias sobrevivían al estrés intestinal posterior. De todas las cepas analizadas, *L. acidophilus* LA-5 resultó tener la mayor tolerancia al estrés gastrointestinal. En cuanto a la capacidad de adhesión, todas las cepas mostraron cierta capacidad de adhesión a células Caco-2, con los valores más altos obtenidos también con *L. acidophilus* LA-5 (7%). Estos resultados sirvieron de base para estudiar la potencial capacidad de exclusión competitiva que *L. acidophilus* podría tener contra cepas patógenas intestinales, como *E. coli* O157:H7 y *Salmonella enteritidis*. La inhibición de la colonización fue evaluada por mecanismos de exclusión, competición y desplazamiento en células Caco-2. Los valores más altos de inhibición se obtuvieron con los ensayos de competición, en los cuales la cepa probiótica, *L. acidophilus* LA-5 y las bacterias enteropatógenas fueron incubadas simultáneamente con las células Caco-2, obteniendo un 52% y un 54% de inhibición de la adhesión de *S. enteritidis* y de *E. coli*, respectivamente.

Son varios los estudios publicados en los que *L. acidophilus* ha mostrado un potencial papel inhibidor de ciertos enteropatógenos, como *Salmonella* spp. y *E. coli* (Candela *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2008; Medellín-Peña y Griffiths, 2009). Candela *et al.*

(2008) observaron que la adhesión de la cepa *L. acidophilus* Bar13 a las células Caco-2 aumentaba cuando éstas estaban previamente colonizadas por *S. choleraesuis* serovar Typhimurium y *E. coli* H10407, mostrando un claro efecto de inhibición por desplazamiento. Por su parte, Lin *et al.* (2008) publicaron que *L. acidophilus* LAP5 era capaz de inhibir a *S. choleraesuis in vitro* y que las razones eran multifactoriales, entre las que señalaron: la alta adhesión de la cepa probiótica a las líneas celulares Caco-2, el bajo pH, la producción de ácidos orgánicos y la producción de bacteriocinas. Según Medellín-Peña *et al.* (2007) la secreción de pequeñas moléculas termoestables y de naturaleza proteica por parte de *L. acidophilus* LA-5 podría ser la causa de la inhibición de *E. coli* O157:H7. Aunque el modo de acción de estas moléculas no está del todo claro, parece ser que además de evitar la adhesión de *E. coli* O157:H7 a las células del epitelio intestinal, estas moléculas secretadas por *L. acidophilus* LA-5 podrían actuar bloqueando los mecanismos de transcripción de los genes relacionados con la colonización y los mecanismos de *quorum sensing* de *E. coli* O157:H7, lo que resultaría en una atenuación de su virulencia (Medellín-Peña y Griffiths, 2009).

La capacidad de parte de la microbiota intestinal para utilizar material no digerible de la dieta le proporciona a estos microorganismos una ventaja selectiva para colonizar el intestino, que además se ve facilitada por la producción de compuestos antimicrobianos como ácidos grasos de cadena corta (SCFA) y ácidos orgánicos. En esta Tesis se consideró de interés analizar el metabolismo fermentativo de las bacterias probióticas en estudio y determinar su capacidad para producir ácidos orgánicos y SCFA. Para llevar a cabo este estudio se analizaron también las actividades enzimáticas de las cepas probióticas y de las bacterias lácticas del cultivo iniciador empleadas en la elaboración de leche fermentada. Las actividades enzimáticas analizadas fueron α - y β -glucosidasas, α - y β -galactosidasas y β -fructofuranosidasa. *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei* y *B. lactis* se crecieron en leche y en medio de cultivo con lactosa o fructooligosacáridos (FOS) como única fuente de carbono. Las cepas probióticas *L. acidophilus* LA-5, *L. casei* LC-01 y *B. lactis* Bb-12 mostraron actividad β -fructofuranosidasa únicamente cuando se habían crecido en presencia de FOS. Existen análisis sobre la utilización de FOS en *L. acidophilus* y *L. casei* que muestran una represión del gen que codifica para la β -fructofuranosidasa cuando se han crecido las bacterias en presencia de glucosa, mientras que se induce en cultivos crecidos en presencia de FOS (Barrangou *et al.*, 2003; Goh *et al.*, 2007). La utilización

de FOS es importante desde el punto de vista funcional para mejorar la supervivencia de las cepas probióticas en el intestino. Su *et al.* (2007) han mostrado que los FOS y la inulina, a diferencia de la glucosa, prolongaron el tiempo de permanencia de *L. acidophilus* LAFTIL10 en el TGI de 24 a 30 h, y de 2 a 6 días, en el caso de *L. casei* LAFTIL26.

Con respecto a las actividades α - y β -glucosidasas y α - y β -galactosidasas, las cinco especies en estudio mostraron actividad β -galactosidasa tanto en cultivos crecidos en leche como en lactosa, aunque la mayor actividad β -galactosidasa se obtuvo con *L. acidophilus* crecido en leche. La importancia de esta actividad enzimática radica en la posibilidad de mejorar la digestión de la lactosa en el intestino humano, disminuyendo así los problemas derivados de la intolerancia a la lactosa (Lourens-Hatting y Viljoen, 2001; Szilagy, 2002). La única especie que mostró actividad β -glucosidasa fue *B. lactis*, actividad que parece ser específica de cepa (Donkor y Shah, 2008). Las actividades α - y β -glucosidasas de *B. lactis*, *L. acidophilus* y *L. casei* están relacionadas con la utilización de substratos interesantes desde el punto de vista funcional, como las isoflavonas presentes en derivados de soja (Donkor y Shah, 2008). Se han caracterizado también dos α -glucosidasas de *B. breve* capaces de hidrolizar la isomaltulosa, también llamada palatinosa, que es uno de los carbohidratos predominantes en la miel (Pokusaeva *et al.*, 2009).

El estudio del crecimiento de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei* y *B. lactis* en glucosa, lactosa o FOS como única fuente de carbono, reveló la preferencia de *B. lactis* para crecer en lactosa sobre glucosa. Este hecho fue descrito también por Parche *et al.* (2006) y Amaretti *et al.* (2007). Por su parte, *L. acidophilus*, *L. casei* y *B. lactis* fueron las únicas especies que crecieron en presencia de FOS, lo que además se correspondió con la presencia de actividad β -fructofuranosidasa en estos microorganismos. El análisis de la producción de ácidos orgánicos y SCFA por las cinco especies en estudio se llevó a cabo también en cultivos con glucosa, lactosa o FOS como única fuente de carbono. En todos los casos, sólo se detectó la formación de los ácidos láctico, acético y fórmico, aunque el principal ácido orgánico producido por las cuatro especies de bacterias lácticas fue el ácido láctico y en el caso de *B. lactis* el ácido acético. Sin embargo, el crecimiento de *L. casei* en presencia de FOS produjo un cambio en el metabolismo fermentativo de este microorganismo hacia la producción de los ácidos acético y fórmico a expensas de ácido láctico, cambio que también ha sido descrito en *Bifidobacterium* spp. en presencia de FOS (Falony *et al.*, 2009). La leche,

por su parte, confirmó ser un buen sustrato de crecimiento para las cuatro especies de bacterias lácticas y *B. lactis* ya que, además de la mayor expresión de la actividad β -galactosidasa, la producción de ácido láctico fue mayor que en el medio MRS con lactosa como única fuente de carbono. La importancia de la producción de ácido láctico por las bacterias se basa en su papel antimicrobiano (De Keersmaecker *et al.*, 2006; Makras *et al.*, 2006). Además de disminuir el pH, el ácido láctico posee un importante efecto inhibitorio contra bacterias Gram negativas al ser capaz de permeabilizar la membrana de estas bacterias (Alakomi *et al.*, 2000; Makras *et al.*, 2006; Makras y de Vuyst, 2006).

En esta Tesis Doctoral también se ha estudiado el papel antimicrobiano de las bacterias lácticas aisladas de productos lácteos nigerianos. Tanto *Weissella* spp. como *L. brevis* demostraron poseer una marcada actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas uropatógenas, posiblemente debido a la producción de ácidos orgánicos. Sin embargo, de las 96 bacterias lácticas analizadas, tan sólo dos cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* debían su efecto inhibitorio a la producción de una sustancia proteica, posiblemente una bacteriocina, cuyo efecto bactericida se observó frente a *L. sakei* pero no contra ninguna de las cepas uropatógenas (Ayeni *et al.*, 2009). La acción y el espectro antimicrobiano, por lo tanto, parecen ser diferentes según el metabolito responsable de la inhibición.

Como se ha mencionado en varios apartados de esta Tesis Doctoral, el efecto bactericida de las bacterias lácticas se debe, en general, a la combinación de la producción de ácidos orgánicos con la posible producción de bacteriocinas. Los recuentos de viabilidad realizados en la leche fermentada probiótica que contenía *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei* y *B. lactis* mostraban valores reducidos de *L. bulgaricus* a diferencia del mismo producto que sólo contenía *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* (Tabasco *et al.*, 2007). Por lo tanto, se llevó a cabo el análisis de la producción de bacteriocinas por las cepas probióticas en estudio. Se realizó un primer ensayo de capacidad antimicrobiana de *L. acidophilus*, *L. casei* y *B. lactis* en el que se añadió *L. bulgaricus* como sobrecapa sobre colonias de cada una de las tres cepas probióticas crecidas en agar. En este ensayo se observó la formación de halos de inhibición de crecimiento alrededor de las colonias de *L. acidophilus* LA-5, mostrando un efecto antimicrobiano frente a *L. bulgaricus*. Sin embargo, el ensayo de

actividad antimicrobiana empleando el sobrenadante de un cultivo puro de *L. acidophilus* no revelaba inhibición alguna sobre *L. bulgaricus*. Existen muchas bacteriocinas cuya producción está regulada por un proceso de inducción. Concretamente las bacteriocinas del tipo IIb se caracterizan por la regulación basada en un sistema de tres componentes: un péptido de inducción, una histidin kinasa (HK) y un regulador de respuesta (RR) (Fontaine *et al.*, 2007). De modo que la activación y secreción del péptido inductor es lo que desencadena la producción de la bacteriocina. A su vez, el mecanismo de autoinducción parece estar asociado a un proceso de *quorum sensing*. Esto quiere decir que la célula productora de la bacteriocina, en presencia de una densidad celular específica, recibe una señal que desencadena la producción del péptido inductor. En otro tipo de bacterias, como *Lactobacillus plantarum* NC8 (Maldonado *et al.*, 2003), *Carnobacterium maltaromaticum* LV17B (Rohde y Quadri, 2006) o *S. thermophilus* LMG18311 (Fontaine *et al.*, 2007), la producción de bacteriocinas requiere del co-cultivo de la bacteria productora con otras bacterias que actúan de inductoras. En esta Tesis Doctoral se ha demostrado que la producción de bacteriocina por *L. acidophilus* LA-5 se induce en co-cultivos con bacterias lácticas viables, pero no con bacterias inductoras inactivadas térmicamente. Al igual que el espectro inhibidor, las bacterias inductoras resultaron ser bacterias relacionadas filogenéticamente con *L. acidophilus* LA-5 y, por tanto, capaces de competir por los mismos nutrientes. Sin embargo, la capacidad de inducción y la sensibilidad a la bacteriocina no estaban relacionadas entre sí, como también demostraron Maldonado *et al.* (2004) con la producción de la plantaricina NC8 por *L. plantarum* NC8. No existen resultados en la bibliografía que nos ayuden a explicar que la producción de bacteriocina por *L. acidophilus* LA-5 se realice sólo con ciertas células viables, pero sí parece ser que el factor desencadenante de la inducción está asociado a las paredes celulares, ya que no se observó inducción con sobrenadantes de cultivos libres de células. Resultados similares se han observado en bacteriocinas producidas por *L. plantarum* (Maldonado *et al.*, 2004a, b; Rojo-Bezarez *et al.*, 2007).

La identidad de la bacteriocina producida por *L. acidophilus* LA-5 se confirmó mediante PCR empleando cebadores diseñados dentro de la secuencia nucleotídica que comparten las bacteriocinas lactacin B, acidocina J1132 y acidocina CH5, todas ellas producidas por *L. acidophilus*. La secuenciación del producto amplificado reveló ser idéntico (100%) al gen *LBA1797*, perteneciente al operón de la lactacina B identificado por Altermann *et al.* (2004) en el genoma de *L. acidophilus* NCFM. El operón de la

lactacina B de *L. acidophilus* NCFM fue identificado por Dobson *et al.* (2007), quienes han descrito que está constituido por 12 genes organizados en tres grupos. Un primer grupo de producción y regulación de la bacteriocina, compuesto por seis genes entre los que se encuentran los que codifican para una histidin kinasa (HK) y una proteína reguladora de respuesta (RR); un segundo grupo de exportación de la bacteriocina formado por tres genes, entre los que están el que codifica para un transportador tipo ABC y una proteína complementaria de transporte; y por último, un tercer grupo compuesto por tres genes de funcionalidad desconocida. En el trabajo presentado en esta Tesis se ha demostrado que el gen *LBA1800* del operón de la lactacina B codifica la producción de un péptido de 54 kDa que forma parte de un sistema de regulación de tres componentes dentro del operón de la lactacina B. El análisis de la expresión de los genes que componen el operón de la lactacin A se llevó a cabo por RT-PCR en tiempo real. Los resultados obtenidos revelaron un aumento de la expresión del gen *lbaB* (*LBA1797*), comparado con el resto de genes implicados en la regulación y transporte, lo que nos permitió identificar a este gen como el gen estructural de la lactacina B, gen que no pudo ser identificado por Dobson *et al.* (2007) cuando caracterizaron el operón de la lactacina B.

Los estudios de expresión del gen *lbaB* mediante RT-PCR en tiempo real indicaron que la lactacina B se transcribe constitutivamente en células no inducidas de *L. acidophilus* LA-5, aunque los niveles secretados de bacteriocina no eran detectados mediante los métodos estándares de inhibición en agar. Nuestros resultados demuestran que parte de la bacteriocina se queda retenida en las paredes celulares y no es liberada al sobrenadante del cultivo puro. La lactacina B se caracteriza por tener cinco aminoácidos catiónicos consecutivos en la secuencia C-terminal del péptido. Este hecho puede hacer que se establezca una fuerte interacción electrostática entre las cargas positivas del péptido secretado y los fosfolípidos de la membrana celular, cargados negativamente (Cotter *et al.*, 2005; Oppegård *et al.*, 2007).

La hipótesis de Hense *et al.* (2007) que establece un nuevo término llamado *efficiency sensing* describe el comportamiento de *L. acidophilus* LA-5 en la producción de la lactacina B. Este mecanismo explicaría que la inducción de la producción de la bacteriocina se produzca sólo cuando existan determinadas células vivas inductoras y coexistan en el mismo ambiente que la bacteria productora de la bacteriocina.

En conclusión, los trabajos de esta Tesis Doctoral han aportado resultados que indican que *L. acidophilus* LA-5, *B. lactis* BB-12 y *L. casei* LC-01 pueden competir con otras bacterias de su entorno a través de distintos mecanismos. Uno de ellos es la utilización de substratos no digeribles en el intestino humano, como FOS, dando lugar al aumento de las actividades enzimáticas fructofuranosida, galactosidasas y glucosidasas, además de la producción de ácidos orgánicos, fundamentalmente ácido láctico y acético.

La capacidad de inhibición de patógenos por competición, exclusión y desplazamiento se ha estudiado en *L. acidophilus* LA-5, ya que fue la cepa que obtuvo los valores más altos de adhesión a las células Caco-2. Los resultados han mostrado que *L. acidophilus* LA-5 es capaz de reducir la adhesión de *S. enteritidis* y *E. coli* a células Caco-2 en más del 50%. Además de inhibir la adhesión de estas bacterias enteropatógenas, se ha demostrado que *L. acidophilus* LA-5 produce una bacteriocina, lactacina B, cuando crece en co-cultivo con *S. thermophilus* o *L. bulgaricus*, ambas especies empleadas en la fabricación del yogur.

IX.3. Efecto de las bacterias probióticas en la diarrea asociada a antibióticos.

La diarrea asociada a tratamiento antibiótico (DAA) es un trastorno común que ocurre entre el 5 y 35% de las personas que están bajo un tratamiento con antibióticos, aunque las cifras varían dependiendo del tipo de antibiótico, de la edad y salud del hospedador (McFarland, 2008). En la mayoría de los casos de DAA se identifica *Clostridium difficile* como agente causante, aunque no siempre es debido a las toxinas producidas por esta bacteria (Dubberke y Wertheimer, 2009). Existe un gran número de estudios basados en el efecto de ciertas bacterias probióticas en la DAA, si bien es difícil compararlos entre sí ya que varían en múltiples factores como son: las cepas probióticas empleadas, la dosis de probiótico ingerido, la población diana sobre la que se hace el estudio, y los parámetros microbiológicos, bioquímicos o clínicos analizados.

En el trabajo realizado para esta Tesis Doctoral hemos colaborado en un estudio clínico con investigadores del Hospital Fundación de Alcorcón en el que se ha evaluado la eficacia de las cepas probióticas *L. acidophilus* LA-5, *B. lactis* BB-12 y *L. casei* LC-01, suministradas en leches fermentadas elaboradas con *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* como cultivo iniciador, para la reducción de DAA. El ensayo clínico fue aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo (leche fermentada sin las cepas probióticas). La leche fermentada probiótica y placebo se suministró de manera aleatorizada a pacientes que empezaron tratamiento con amoxicilina-clavulánico o levofloxacino. Los resultados del estudio clínico mostraron que el consumo diario de los probióticos no provocaba diferencias significativas en la aparición de diarrea, duración del trastorno, máximo número de deposiciones o prolongación del tiempo de hospitalización. Los estudios clínicos en los que se ha investigado el efecto de lactobacilos y bifidobacterias para prevenir la DAA ofrecen resultados divergentes. Beausoleil *et al.* (2007), Hickson *et al.* (2007) y Wenus *et al.* (2008) entre otros, encontraron una disminución de la DAA tras la administración de varias cepas probióticas de *L. acidophilus*, *L. casei*, o *Bifidobacterium* spp. Por el contrario, Thomas *et al.* (2001), Conway *et al.* (2007), Safdar *et al.* (2008) y Szymanski *et al.* (2008) no encontraron mejoría respecto a la DAA tras el consumo de diferentes productos con bacterias probióticas en cuya composición se encontraban *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* GG o *B. lactis*. En definitiva,

el efecto de una cepa probiótica no se debe extrapolar al de otras de la misma especie. Los estudios también parecen indicar que el efecto de los probióticos en la DAA se ve más favorecido en niños que en adultos y la especie que más veces ha demostrado disminuir los síntomas o aparición de la DAA es *Saccharomyces boulardii* (Cremonini *et al.*, 2002; D'Souza *et al.*, 2002; Kotowska *et al.* 2005; Mehmet *et al.*, 2006).

Las muestras fecales de un número representativo de pacientes de los grupos probiótico y placebo se evaluaron con el objeto de determinar el grado de colonización de las cepas probióticas en los pacientes. Para ello, se llevaron a cabo estudios de recuentos de microbiota intestinal cultivable y de las cepas probióticas, así como se determinaron el contenido de SCFA y las actividades enzimáticas del contenido fecal. A pesar de que la aparición de DAA se suele asociar al desequilibrio de la microbiota intestinal causado por el tratamiento con antibióticos (Dubberke y Wertheimer, 2009), no se identificó ningún grupo bacteriano cuyos recuentos se modificaran significativamente durante el ensayo clínico. Lo más destacado del estudio fue que en el periodo de finalización del tratamiento antibiótico, el recuento de bacteroides y enterobacterias en el grupo probiótico fue menor ($P < 0.05$) que en el grupo placebo y que, dentro del grupo probiótico, el recuento de anaerobios totales disminuyó ($P < 0.05$) a lo largo del tratamiento. Mättö *et al.* (2006) también observaron una disminución de enterobacterias durante el periodo de consumo de probióticos, aunque los cambios no fueron significativos. Por otro lado, el descenso del recuento de bacteroides que en este trabajo se podría asociar al consumo de leche fermentada con bacterias probióticas, también fue observado por García-Albiach *et al.* (2008) tras el consumo sólo de yogur.

La cuantificación de las cepas probióticas *L. acidophilus* LA-5, *L. casei* LC-01 y *B. lactis* BB-12 en el material fecal se realizó empleando la técnica RTi-PCR con las muestras de aquellas personas que habían consumido la leche fermentada probiótica. A pesar de que los límites de detección obtenidos con este procedimiento fueron bajos, 10^3 ufc/g fecal para *B. lactis* y *L. acidophilus* y 10^5 ufc/g fecal para *L. casei*, no se obtuvieron diferencias significativas durante el ensayo clínico en cuanto al porcentaje de detección de las cepas ni en los recuentos obtenidos. Los resultados del análisis por RTi-PCR de las cepas probióticas revelaron una alta variabilidad entre individuos. También se llevó a cabo el análisis de resultados de muestras procedentes de un mismo paciente durante los sucesivos periodos de toma de muestras para poder detectar cambios individuales debidos al ensayo clínico, pero no se observó ninguna tendencia.

Las actividades enzimáticas que se analizaron en las muestras fecales fueron, por una parte, las actividades enzimáticas consideradas perjudiciales, como β -glucuronidasa, azorreductasa y nitrorreductasa, y por otra parte, las actividades α - y β -glucosidasas y α - y β -galactosidasas. Se ha descrito que los probióticos podrían modificar la actividad metabólica colónica a través de la inhibición de la actividad de las enzimas de la microbiota que transforman las sustancias procarcinógenas en carcinógenas, como son las enzimas β -glucuronidasa, azorreductasa y nitrorreductasa (Commane *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos en las muestras de pacientes mostraron que la actividad β -galactosidasa fue la mayoritaria en ambos grupos, probiótico y placebo, a lo largo del periodo de estudio. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre los grupos en relación a ninguna de las actividades enzimáticas analizadas. Al igual que en las actividades enzimáticas, el análisis de los ácidos orgánicos en las muestras fecales de los dos grupos (probiótico y placebo) mostraron una importante variabilidad en los resultados entre individuos. La única diferencia estadística observada fue el aumento del contenido de los ácidos láctico y acético a los pocos días de inicio del consumo de leche fermentada por el grupo probiótico. Sin embargo, estos valores no fueron consistentes con un aumento de las bacterias probióticas en ese periodo.

Se puede considerar que el suministro diario de 10^9 ufc de *L. acidophilus* La-5 y *L. casei* LC-01 y de 10^{10} ufc *B. lactis* Bb-12 en leche fermentada no representa una dosis suficiente para ejercer ningún efecto en la DAA en adultos. Adicionalmente, debe tenerse en cuenta la pérdida de viabilidad de las bacterias durante su paso por el TGI (Fernández de Palencia *et al.*, 2008), así como la sensibilidad de las cepas probióticas a los antibióticos administrados en el ensayo clínico (resultados no mostrados). Ambas circunstancias pueden suponer una pérdida en varias unidades logarítmicas del número de células viables que pueden alcanzar el colon. De hecho, a lo largo del estudio, el porcentaje de detección de cepas probióticas en los pacientes no superó el 50% en ninguno de los periodos de estudio durante el ensayo clínico. Existen estudios que evidencian la importancia de la dosis de las bacterias probióticas consumidas para que puedan ejercer un efecto beneficioso. Se ha demostrado que *L. rhamnosus* GG es efectivo en la prevención de la DAA sólo en dosis superiores a 10^{10} - 10^{11} ufc (Thomas *et al.*, 2001; Guarino *et al.*, 2009). Recientemente, el consumo de una leche fermentada con diez especies probióticas por 41 personas bajo tratamiento con amoxicilina, no produjo diferencias entre los grupos placebo y probiótico en la composición ni en la

actividad enzimática de la microbiota (Koning *et al.*, 2008). La dosis total de las especies probióticas era de 10^{10} ufc/ g, lo que nuevamente pudo influir en la falta de efectividad observada.

Se puede concluir del presente estudio que la combinación de *L. acidophilus* LA-5, *L. casei* LC-01 y *B. lactis* Bb-12, en dosis diarias de 10^9 – 10^{10} ufc suministradas en leche fermentada no disminuye la diarrea en adultos mayores de 70 años que están bajo tratamiento de amoxicilina/clavulánico o levofloxacino. El consumo de estos probióticos tampoco causa modificaciones significativas en la composición de la microbiota intestinal ni en el metabolismo fermentativo intestinal de los pacientes.

X. CONCLUSIONES

PRIMERA.

Se han desarrollado nuevos medios de cultivo selectivos y diferenciales que han permitido la cuantificación específica de las especies *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium lactis*, contenidas en leche fermentada. El empleo de la técnica de PCR en tiempo real (RTi-PCR) asociada a la monoazida de propidio ha permitido diferenciar las células viables contenidas en leche fermentada sin el previo aislamiento en medios de cultivo y, por lo tanto, aportando una mayor rapidez para la identificación, detección y cuantificación de estas especies.

SEGUNDA

La viabilidad de las cinco especies en estudio contenidas en leche fermentada fue aceptable para todas las especies durante los 28 días de vida útil del producto y solo se vio comprometida después de la fecha de caducidad para *L. acidophilus* y *L. bulgaricus*. Dicha pérdida de viabilidad fue detectada de igual manera empleando el procedimiento de recuento en placa que mediante la cuantificación por RTi-PCR. Este hecho ha asegurado el suministro de leche fermentada con niveles elevados de bacterias probióticas viables durante todo el periodo de incorporación de pacientes en el ensayo clínico.

TERCERA

Se han diseñado secuencias genéticas específicas que han permitido identificar y cuantificar a las especies *L. acidophilus*, *L. casei* y *B. lactis* dentro de la microbiota intestinal por PCR-DGGE y RTi-PCR.

CUARTA

L. acidophilus LA-5, *B. lactis* BB-12 y *L. casei* LC-01 pueden competir en ensayos *in vitro* con otras bacterias de su entorno mediante la utilización de sustratos

no digeribles en el intestino humano, como oligofructosas, dando lugar al aumento de las actividades enzimáticas fructofuranosida, galactosidasas y glucosidasas, además de la producción de ácidos orgánicos, fundamentalmente ácido láctico y acético.

QUINTA

L. acidophilus LA-5 ha demostrado mediante mecanismos de competición *in vitro* que es capaz de reducir la adhesión de *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli* a células Caco-2. *L. acidophilus* LA-5 posee como mecanismos de actividad antimicrobiana una elevada producción de ácido láctico y la capacidad de secretar una bacteriocina, lactacina B, en presencia de células viables de especies normalmente presentes en su entorno.

SEXTA

La expresión de lactacina B por *L. acidophilus* LA-5 está regulada por un mecanismo señal de auto-inducción a través de un péptido inductor secretado por la bacteria que activa un sistema regulador compuesto por una histidin kinasa y un regulador de respuesta.

SÉPTIMA

El consumo de *L. acidophilus* LA-5, *L. casei* LC-01 y *B. lactis* Bb-12 en dosis diarias de 10^9 – 10^{10} unidades formadoras de colonias suministradas en leche fermentada no causa modificaciones significativas en la composición de la microbiota intestinal ni en el metabolismo fermentativo intestinal de pacientes adultos mayores de 70 años que están bajo tratamiento de amoxicilina/clavulánico o levofloxacino. El consumo de estos probióticos tampoco provoca diferencias significativas en la aparición de diarrea en los pacientes.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Adlerberth, I, Strachan, D P, Matricardi, P M, *et al.* (2007) Gut microbiota and development of atopic eczema in 3 European birth cohorts. *J Allergy Clin Immunol* **120** 343-350.
- Alakomi, H L, Skytta, E, Saarela, M, Mattila-Sandholm, T, Latva-Kala, K and Helander, I M (2000) Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl Environ Microbiol* **66** 2001-2005.
- Altermann, E, Buck, L B, Cano, R and Klaenhammer, T R (2004) Identification and phenotypic characterization of the cell-division protein CdpA. *Gene* **342** 189-197.
- Amann, R I, Ludwig, W and Schleifer, K H (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59** 143-169.
- Amaretti, A, Bernardi, T, Tamburini, E, *et al.* (2007) Kinetics and metabolism of *Bifidobacterium adolescentis* MB 239 growing on glucose, galactose, lactose, and galactooligosaccharides. *Appl Environ Microbiol* **73** 3637-3644.
- Ayeni, F A, Adeniyi, B A, Ogunbanwo, S T, *et al.* (2009) Inhibition of uropathogens by lactic acid bacteria isolated from dairy foods and cow's intestine in western Nigeria. *Arch Microbiol* **191** 639-648.
- Bae, S and Wuertz, S (2009) Discrimination of viable and dead fecal *Bacteroidales* bacteria by quantitative PCR with propidium monoazide. *Appl Environ Microbiol* **75** 2940-2944.
- Barrangou, R, Altermann, E, Hutkins, R, Cano, R and Klaenhammer, T R (2003) Functional and comparative genomic analyses of an operon involved in fructooligosaccharide utilization by *Lactobacillus acidophilus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** 8957-8962.
- Barrangou, R, Azcarate-Peril, M A, Duong, T, Connors, S B, Kelly, R M and Klaenhammer, T R (2006) Global analysis of carbohydrate utilization by *Lactobacillus acidophilus* using cDNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** 3816-3821.
- Beausoleil, M, Fortier, N, Guenette, S, *et al.* (2007) Effect of a fermented milk combining *Lactobacillus acidophilus* C11285 and *Lactobacillus casei* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Can J Gastroenterol* **21** 732-736.
- Berthier, F and Ehrlich, S D (1999) Genetic diversity within *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* and design of PCR primers for its detection using randomly amplified polymorphic DNA. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 3** 997-1007.
- BOE. (2003) RD 179/2003, de 14 de febrero, por el que se aprueba la Norma de Calidad para el yogur o yoghurt. BOE N° **42**, pp. 6448–6450.

- Boonyaritichai, S, Kuwabara, K, Nagano, J, Kobayashi, K and Koga, Y (2009) Long-term administration of probiotics to asymptomatic pre-school children for either the eradication or the prevention of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* **14** 202-207.
- Borchers, a T, Selmi, C, Meyers, F J, Keen, C L and Gershwin, M E (2009) Probiotics and immunity. *J Gastroenterol* **44** 26-46.
- Borruel, N, Carol, M, Casellas, F, *et al.* (2002) Increased mucosal tumour necrosis factor alpha production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria. *Gut* **51** 659-664.
- Botina, S G, Tsygankov Iu, D and Sukhodolets, V V (2006) Identification of industrial strains of lactic acid bacteria by methods of molecular genetic typing]. *Genetika* **42** 1621-1635.
- Boyle, R J and Tang, M L (2006) Can allergic diseases be prevented prenatally? *Allergy* **61** 1423-1431.
- Candela, M, Perna, F, Carnevali, P, *et al.* (2008) Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *Int J Food Microbiol* **125** 286-292.
- Candela, M, Seibold, G, Vitali, B, Lachenmaier, S, Eikmanns, B J and Brigidi, P (2005) Real-time PCR quantification of bacterial adhesion to Caco-2 cells: competition between bifidobacteria and enteropathogens. *Res Microbiol* **156** 887-895.
- Carroll, I M, Threadgill, D W and Threadgill, D S (2009) The gastrointestinal microbiome: a malleable, third genome of mammals. *Mamm Genome* **20** 395-403.
- Cawthorn, D M and Witthuhn, R C (2008) Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide. *J Appl Microbiol* **105** 1178-1185.
- CODEX Alimentarius Commission (2003) *CODEX standard for fermented milks*. Codex Stan 243-2003. http://www.codexalimentarius.net/download/standards/400/CXS_243e.pdf.
- Collins, M D and Gibson, G R (1999) Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am J Clin Nutr* **69** 1052S-1057S.
- Commane, D, Hughes, R, Shortt, C and Rowland, I (2005) The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. *Mutat Res* **591** 276-289.
- Conway, S, Hart, A, Clark, A and Harvey, I (2007) Does eating yogurt prevent antibiotic-associated diarrhoea? A placebo-controlled randomised controlled trial in general practice. *Br J Gen Pract* **57** 953-959.

- Correa, N B, Peret Filho, L A, Penna, F J, Lima, F M and Nicoli, J R (2005) A randomized formula controlled trial of *Bifidobacterium lactis* and *Streptococcus thermophilus* for prevention of antibiotic-associated diarrhea in infants. *J Clin Gastroenterol* **39** 385-389.
- Cotter, P D, Hill, C and Ross, R P (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* **3** 777-788.
- Cremonini, F, Di Caro, S, Nista, E C, *et al.* (2002) Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhoea. *Aliment Pharmacol Ther* **16** 1461-1467.
- Champagne, C.P., Gardner, N.J. (2005) Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **45** 61-84.
- Chey, W D and Wong, B C (2007) American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* **102** 1808-1825.
- Chouraqui, J P, Van Egroo, L D and Fichot, M C (2004) Acidified milk formula supplemented with bifidobacterium lactis: impact on infant diarrhea in residential care settings. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **38** 288-292.
- Darukaradhyia, J, Phillips, M, Kailasapathy, K (2006) Selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., starter lactic acid bacteria and non-starter lactic acid bacteria from Cheddar cheese. *Int Dairy J* **16** 439-435.
- De Jong, A, Van Hijum, S A F T, Bijlsma, J J E, Kok, J and Kuipers, O P (2006) BAGEL: A web-based bacteriocin genome mining tool. *Nucleic Acids Res* **34** W273–W279.
- De Keersmaecker, S C, Verhoeven, T L, Desair, J, Marchal, K, Vanderleyden, J and Nagy, I (2006) Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid. *FEMS Microbiol Lett* **259** 89-96.
- D'souza, a L, Rajkumar, C, Cooke, J and Bulpitt, C J (2002) Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *BMJ* **324** 1361.
- De Vrese, M and Schrezenmeir, J (2008) Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **111** 1-66.
- Dinoto, A, Marques, T M, Sakamoto, K, *et al.* (2006) Population dynamics of *Bifidobacterium* species in human feces during raffinose administration monitored by fluorescence in situ hybridization-flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* **72** 7739-7747.
- Diario Oficial de la Unión Europea (2007) Reglamento (CE) No 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. DOUE de 18-01-2007, pp. L12/3–L12/18.

- Dobson, A E, Sanozky-Dawes, R B and Klaenhammer, T R (2007) Identification of an operon and inducing peptide involved in the production of lactacin B by *Lactobacillus acidophilus*. *J Appl Microbiol* **103** 1766-1778.
- Donkor, O N and Shah, N P (2008) Production of beta-glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and *Lactobacillus casei* in soymilk. *J Food Sci* **73** M15-20.
- Dubberke, E R and Wertheimer, a I (2009) Review of current literature on the economic burden of *Clostridium difficile* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* **30** 57-66.
- Duncan, S H, Belenguer, A, Holtrop, G, Johnstone, a M, Flint, H J and Lobley, G E (2007) Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Appl Environ Microbiol* **73** 1073-1078.
- Dunne, C, O'mahony, L, Murphy, L, *et al.* (2001) In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am J Clin Nutr* **73** 386S-392S.
- Ehrmann, M, Ludwig, W and Schleifer, K H (1994) Reverse dot blot hybridization: a useful method for the direct identification of lactic acid bacteria in fermented food. *FEMS Microbiol Lett* **117** 143-149.
- Eijsink, V G, Axelsson, L, Diep, D B, Havarstein, L S, Holo, H and Nes, I F (2002) Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81** 639-654.
- Falony, G, Lazidou, K, Verschaeren, A, Weckx, S, Maes, D and De Vuyst, L (2009) In vitro kinetic analysis of fermentation of prebiotic inulin-type fructans by *Bifidobacterium* species reveals four different phenotypes. *Appl Environ Microbiol* **75** 454-461.
- FAO/WHO (2002) Guidelines for the evaluation of probiotics in food. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.
- Fasoli, S, Marzotto, M, Rizzotti, L, Rossi, F, Dellaglio, F and Torriani, S (2003) Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *Int J Food Microbiol* **82** 59-70.
- Fernández de Palencia, P, López, P, Corbí, A L and Requena, T (2008) Probiotic strains: survival under simulated gastrointestinal conditions, in vitro adhesion to Caco-2 cells and effect on cytokine secretion *Eur Food Res Technol* **227** 1475–1484.

- Fischer, S G and Lerman, L S (1983) DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80** 1579-1583.
- Flekna, G, Stefanic, P, Wagner, M, Smulders, F J, Mozina, S S and Hein, I (2007) Insufficient differentiation of live and dead *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes* cells by ethidium monoazide (EMA) compromises EMA/real-time PCR. *Res Microbiol* **158** 405-412.
- Fontaine, L, Boutry, C, Guedon, E, *et al.* (2007) Quorum-sensing regulation of the production of Blp bacteriocins in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* **189** 7195-7205.
- Fuller, R (1989) Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* **66**, 365–378.
- Furet, J P, Quenee, P and Tailliez, P (2004) Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. *Int J Food Microbiol* **97** 197-207.
- Furrie, E, Macfarlane, S, Kennedy, A, *et al.* (2005) Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. *Gut* **54** 242-249.
- Garcia-Albiach, R, Jose, M, De Felipe, P, *et al.* (2008) Molecular analysis of yogurt containing *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in human intestinal microbiota. *Am J Clin Nutr* **87** 91-96.
- Gibson, G R and Robrefroid, M B (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* **125** 1401-12.
- Gibson, G R, Probert, H M, Van Loo, J, Rastall, R A. and Roberfroid, M B (2004) Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev* **17** 259-275.
- Gibson, C A, Staley, M D and Baumrucker, C R (1999) Identification of IGF binding proteins in bovine milk and the demonstration of IGFBP-3 synthesis and release by bovine mammary epithelial cells. *J Anim Sci* **77** 1547-1557.
- Gill, H S, Rutherford, K J, Cross, M L and Gopal, P K (2001) Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *Am J Clin Nutr* **74** 833-839.
- Gill, S R, Pop, M, Deboy, R T, *et al.* (2006) Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* **312** 1355-1359.

- Goh, Y J, Lee, J H and Hutkins, R W (2007) Functional analysis of the fructooligosaccharide utilization operon in *Lactobacillus paracasei* 1195. *Appl Environ Microbiol* **73** 5716-5724.
- Greany, K A, Bonorden, M J, Hamilton-Reeves, J M, *et al.* (2008) Probiotic capsules do not lower plasma lipids in young women and men. *Eur J Clin Nutr* **62** 232-237.
- Guandalini, S, Pensabene, L, Zikri, M A, *et al.* (2000) *Lactobacillus* GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **30** 54-60.
- Guarino, A, Lo Vecchio, A and Canani, R B (2009) Probiotics as prevention and treatment for diarrhea. *Curr Opin Gastroenterol* **25** 18-23.
- Guarner, F and Malagelada, J R (2003) Gut flora in health and disease. *Lancet* **361** 512-519.
- Gurtler, V and Stanisich, V A (1996) New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* **142** (Pt 1) 3-16.
- Guslandi, M (2003) Probiotics for chronic intestinal disorders. *Am J Gastroenterol* **98** 520-521.
- Guslandi, M, Mezzi, G, Sorghi, M and Testoni, P A (2000) *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* **45** 1462-1464.
- Haarman, M and Knol, J (2005) Quantitative real-time PCR assays to identify and quantify fecal *Bifidobacterium* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Appl Environ Microbiol* **71** 2318-2324.
- Haarman, M and Knol, J (2006) Quantitative real-time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Appl Environ Microbiol* **72** 2359-2365.
- Hammami, R, Zouhir, A, Ben Hamida, J and Fliss, I (2007) BACTIBASE: a new web-accessible database for bacteriocin characterization. *BMC Microbiol* **7** 89.
- Handelsman, J (2004) Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev* **68** 669-685.
- Harmsen, H J, Wildeboer-Veloo, a C, Raangs, G C, *et al.* (2000) Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **30** 61-67.
- He, F, Ouwehand, a C, Isolauri, E, Hosoda, M, Benno, Y and Salminen, S (2001) Differences in composition and mucosal adhesion of bifidobacteria isolated from healthy adults and healthy seniors. *Curr Microbiol* **43** 351-354.

- Hekmat, S, Soltani, H, Reid, G (2009) Growth and survival of *Lactobacillus reuteri* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 in yogurt for use as a functional food. *Innovative Food Sci and Emergenging Technol* **10** 293-296.
- Heng, N C, Ragland, N L, Swe, P M, *et al.* (2006) Dysgalacticin: a novel, plasmid-encoded antimicrobial protein (bacteriocin) produced by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *Microbiology* **152** 1991-2001.
- Hense, B A, Kuttler, C, Muller, J, Rothballer, M, Hartmann, A and Kreft, J U (2007) Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? *Nat Rev Microbiol* **5** 230-239.
- Hickson, M, D'souza, a L, Muthu, N, *et al.* (2007) Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. *BMJ* **335** 80.
- Hold, G L, Pryde, S E, Russell, V J, Furrie, E and Flint, H J (2002) Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Ecol* **39** 33-39.
- Hols, P, Hancy, F, Fontaine, L, Grossiord, B, Prozzi, D, Leblond-Bourget, N, Decaris, B, Bolotin, A, Delorme, C, Ehrlich, S D, Guedon, E, Monnet, W, Renault, P and Kleerebezem, M (2005) New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews* **29** 435–463.
- Holzappel, W H, Haberer, P, Snel, J, Schillinger, U and Huis In't Veld, J H (1998) Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* **41** 85-101.
- Hopkins, M J and Macfarlane, G T (2002) Changes in predominant bacterial populations in human faeces with age and with *Clostridium difficile* infection. *J Med Microbiol* **51** 448-454.
- Hosoya, N (1998) Health claims in Japan. *Japanese Journal of Nutritional Food* **1** 1-11.
- Ibekwe, a M and Grieve, C M (2003) Detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in environmental samples by real-time PCR. *J Appl Microbiol* **94** 421-431.
- Inglis, G D and Kalischuk, L D (2004) Direct quantification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter lanienae* in feces of cattle by real-time quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol* **70** 2296-2306.
- ISO (2002). Yogurt- Enumeration of characteristics microorganisms- Colony count technique at 37 °C. ISO/FDIS 7889 IDF 117. Geneva, Switzerland: International Organisation for Standardization.

- Isolauri, E, Sutas, Y, Kankaanpää, P, Arvilommi, H and Salminen, S (2001) Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr* **73** 444S-450S.
- Jansen, G J, Wildeboer-Veloo, a C, Tonk, R H, Franks, a H and Welling, G W (1999) Development and validation of an automated, microscopy-based method for enumeration of groups of intestinal bacteria. *J Microbiol Methods* **37** 215-221.
- Jia, W, Li, H, Zhao, L and Nicholson, J K (2008) Gut microbiota: a potential new territory for drug targeting. *Nat Rev Drug Discov* **7** 123-129.
- Juste, A, Thomma, B P and Lievens, B (2008) Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiol* **25** 745-761.
- Kalliomäki, M, Salminen, S, Arvilommi, H, Kero, P, Koskinen, P and Isolauri, E (2001) Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **357** 1076-1079.
- Kato, K, Mizuno, S, Umesaki, Y, *et al.* (2004) Randomized placebo-controlled trial assessing the effect of bifidobacteria-fermented milk on active ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* **20** 1133-1141.
- Kim, J F, Jeong, H, Yu, D S, *et al.* (2009) Genome sequence of the probiotic bacterium *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* AD011. *J Bacteriol* **191** 678-679.
- Klaenhammer, T R, Barrangou, R, Buck, B L, Azcarate-Peril, M A and Altermann, E (2005) Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol Rev* **29** 393-409.
- Klare, I, Konstabel, C, Werner, G, *et al.* (2007) Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *J Antimicrob Chemother* **59** 900-912.
- Kleerebezem, M (2004) Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides* **25** 1405-1414.
- Klein, A, Friedrich, U, Vogelsang, H and Jahreis, G (2008) *Lactobacillus acidophilus* 74-2 and *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DGCC 420 modulate unspecific cellular immune response in healthy adults. *Eur J Clin Nutr* **62** 584-593.
- Klein, K and Stevens, R (2008) The clinical use of probiotics for young children. *J Fam Health Care* **18** 66-68.
- Klijn, A, Mercenier, A and Arigoni, F (2005) Lessons from the genomes of bifidobacteria. *FEMS Microbiol Rev* **29** 491-509.

- Koning, C J, Jonkers, D M, Stobberingh, E E, Mulder, L, Rombouts, F M and Stockbrugger, R W (2008) The effect of a multispecies probiotic on the intestinal microbiota and bowel movements in healthy volunteers taking the antibiotic amoxycillin. *Am J Gastroenterol* **103** 178-189.
- Kopp, M V, Niggemann, B and Forster, J (2009) House dust mite allergy: complete removal of the provoking allergen is a primary therapeutic approach. *Allergy* **64** 187-188; author reply 190.
- Kotowska, M, Albrecht, P and Szajewska, H (2005) *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* **21** 583-590.
- Kukkonen, K, Savilahti, E, Haahtela, T, *et al.* (2007) Probiotics and prebiotic galactooligosaccharides in the prevention of allergic diseases: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* **119** 192-198.
- Kurokawa, K, Itoh, T, Kuwahara, T, *et al.* (2007) Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res* **14** 169-181.
- Lahtinen, S J, Gueimonde, M, Ouwehand, a C, Reinikainen, J P and Salminen, S J (2005) Probiotic bacteria may become dormant during storage. *Appl Environ Microbiol* **71** 1662-1663.
- Laitinen, R, Malinen, E and Palva, A (2002) PCR-ELISA I: Application to simultaneous analysis of mixed bacterial samples composed of intestinal species. *Syst Appl Microbiol* **25** 241-248.
- Lerman, L S, Fischer, S G, Hurley, I, Silverstein, K and Lumelsky, N (1984) Sequence-determined DNA separations. *Annu Rev Biophys Bioeng* **13** 399-423.
- Lesbros-Pantoflickova, D, Corthesy-Theulaz, I and Blum, a L (2007) *Helicobacter pylori* and probiotics. *J Nutr* **137** 812S-818S.
- Li, M, Wang, B, Zhang, M, *et al.* (2008a) Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105** 2117-2122.
- Li, W, Wooley, J C and Godzik, A (2008b) Probing metagenomics by rapid cluster analysis of very large datasets. *PLoS One* **3** e3375.
- Lilly, D M and Stillwell, R H (1965) Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science* **147** 747-748.
- Lin, C K, Tsai, H C, Lin, P P, Tsen, H Y and Tsai, C C (2008) *Lactobacillus acidophilus* LAP5 able to inhibit the *Salmonella choleraesuis* invasion to the human Caco-2 epithelial cell. *Anaerobe* **14** 251-255.

- Liong, M T (2008) Roles of Probiotics and Prebiotics in Colon Cancer Prevention: Postulated Mechanisms and In-vivo Evidence. *Int J Mol Sci* **9** 854-863.
- Loessner, M, Guenther, S, Steffan, S and Scherer, S (2003) A pediocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain inhibits *Listeria monocytogenes* in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium. *Appl Environ Microbiol* **69** 1854-1857.
- Lomax, a R and Calder, P C (2009) Probiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence from studies conducted in humans. *Curr Pharm Des* **15** 1428-1518.
- Lorea Baroja, M, Kirjavainen, P V, Hekmat, S and Reid, G (2007) Anti-inflammatory effects of probiotic yogurt in inflammatory bowel disease patients. *Clin Exp Immunol* **149** 470-479.
- Lourens-Hattingh, A and Viljoen, B (2001) Yogurt as probiotic carrier food. *Int. Dairy J* **11** 1-17.
- Lund, M, Nordentoft, S, Pedersen, K and Madsen, M (2004) Detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples by real-time PCR. *J Clin Microbiol* **42** 5125-5132.
- Makras, L and De Vuyst, L (2006) The in vitro inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. *Int. Dairy J* **16** 1049-1057.
- Makras, L, Triantafyllou, V, Fayol-Messaoudi, D, *et al.* (2006) Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Res Microbiol* **157** 241-247.
- Maldonado, A, Jimenez-Diaz, R and Ruiz-Barba, J L (2004a) Induction of plantaricin production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after coculture with specific gram-positive bacteria is mediated by an autoinduction mechanism. *J Bacteriol* **186** 1556-1564.
- Maldonado, A, Ruiz-Barba, J L and Jimenez-Diaz, R (2003) Purification and genetic characterization of plantaricin NC8, a novel coculture-inducible two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. *Appl Environ Microbiol* **69** 383-389.
- Maldonado, A, Ruiz-Barba, J L and Jimenez-Diaz, R (2004b) Production of plantaricin NC8 by *Lactobacillus plantarum* NC8 is induced in the presence of different types of gram-positive bacteria. *Arch Microbiol* **181** 8-16.
- Malinen, E, Kassinen, A, Rinttila, T and Palva, A (2003) Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted

- oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology* **149** 269-277.
- Malinen, E, Matto, J, Salmitie, M, Alander, M, Saarela, M and Palva, A (2002) PCR-ELISA II: Analysis of *Bifidobacterium* populations in human faecal samples from a consumption trial with *Bifidobacterium lactis* Bb-12 and a galacto-oligosaccharide preparation. *Syst Appl Microbiol* **25** 249-258.
- Malinen, E, Rinttila, T, Kajander, K, *et al.* (2005) Analysis of the fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients and healthy controls with real-time PCR. *Am J Gastroenterol* **100** 373-382.
- MARM Web (2009) Datos sobre el Consumo Alimentario en España. <http://www.mapa.es/es/alimentacion/pags/consumo/ultimdatos.htm>.
- Marteau, P, Lemann, M, Seksik, P, *et al.* (2006) Ineffectiveness of *Lactobacillus johnsonii* LA1 for prophylaxis of postoperative recurrence in Crohn's disease: a randomised, double blind, placebo controlled GETAID trial. *Gut* **55** 842-847.
- Marteau, P, Pochart, P, Dore, J, Bera-Maillet, C, Bernalier, A and Corthier, G (2001) Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* **67** 4939-4942.
- Martin, R, Langa, S, Reviriego, C, *et al.* (2003) Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr* **143** 754-758.
- Martín-Diana, A B, Janer, C, Peláez, C and Requena, T (2003) Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria *Int Dairy J* **13** 827-833.
- Matto, J, Maunuksela, L, Kajander, K, *et al.* (2005) Composition and temporal stability of gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome--a longitudinal study in IBS and control subjects. *FEMS Immunol Med Microbiol* **43** 213-222.
- Maukonen, J, Matto, J, Suihko, M L and Saarela, M (2008) Intra-individual diversity and similarity of salivary and faecal microbiota. *J Med Microbiol* **57** 1560-1568.
- Marx, S P, Winkler, S and Hartmeier, W (2000) Metabolization of β - (2,6)- lined fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria *FEMS Microbiol Letter* **182** 163-169.
- Mayo, B, Marzotto, M, Flórez, A B, Torriani, S (2008) Culture-independent microbial techniques in dairy microbiology: the state of the art. En: *Molecular aspects of lactic acid bacteria for traditional and new applications* (eds. Baltasar Mayo, Paloma López, Gaspar Pérez-Martínez). Research Signpost, Kerala, India, pp. 1-27.
- Mcfarland, L V (2008a) Antibiotic-associated diarrhea: epidemiology, trends and treatment. *Future Microbiol* **3** 563-578.

- Mcfarland, L V (2008b) State-of-the-art of irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease research in 2008. *World J Gastroenterol* **14** 2625-2629.
- Mcfarland, L V and Dublin, S (2008) Meta-analysis of probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* **14** 2650-2661.
- Medellin-Pena, M J and Griffiths, M W (2009) Effect of molecules secreted by *Lactobacillus acidophilus* strain La-5 on *Escherichia coli* O157:H7 colonization. *Appl Environ Microbiol* **75** 1165-1172.
- Medellin-Pena, M J, Wang, H, Johnson, R, Anand, S and Griffiths, M W (2007) Probiotics affect virulence-related gene expression in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **73** 4259-4267.
- Mehmet, C, Bulent, B, Ismail, A, Murat, BC, Alaadin, P (2006) Prophylactic *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a prospective study. *Med Sc. Monit* **12** 119-122.
- Moayednia, N, Rehsani, MR, Emamdjomeh, Z, Mazaheri, AF (2009) Effect of refrigerated storage time on the viability of probiotic bacteria in fermented probiotic milk drinks. *Int J Dairy Technol* **62** 204-208.
- Molin, S and Givskov, M (1999) Application of molecular tools for in situ monitoring of bacterial growth activity. *Environ Microbiol* **1** 383-391.
- Muyzer, G and Smalla, K (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73** 127-141.
- Mättö, J, Fondén, R, Tolvanen, T, von Wright, A, Vilpponen-Salmela, T, Satokari, R, Saarela, M (2006) Intestinal survival and persistence of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains administered in triple-strain yoghurt. *Int Dairy J* **16** 1174-1180.
- Nadal, I, Santacruz, A, Marcos, A, *et al.* (2009) Shifts in clostridia, bacteroides and immunoglobulin-coating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents. *Int J Obes (Lond)* **33** 758-767.
- Nocker, A and Camper, a K (2009) Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. *FEMS Microbiol Lett* **291** 137-142.
- Nocker, A and Camper, a K (2006) Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. *Appl Environ Microbiol* **72** 1997-2004.

- Nocker, A, Cheung, C Y and Camper, a K (2006) Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J Microbiol Methods* **67** 310-320.
- Nogva, H K, Dromtorp, S M, Nissen, H and Rudi, K (2003) Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *Biotechniques* **34** 804-808, 810, 812-803.
- Nomoto, K (2005) Prevention of infections by probiotics. *J Biosci Bioeng* **100** 583-592.
- O'mahony, L, Mccarthy, J, Kelly, P, *et al.* (2005) *Lactobacillus* and *bifidobacterium* in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology* **128** 541-551.
- Ogawa, T, Asai, Y, Tamai, R, *et al.* (2006) Natural killer cell activities of synbiotic *Lactobacillus casei* ssp. *casei* in conjunction with dextran. *Clin Exp Immunol* **143** 103-109.
- Ogier, J C, Son, O, Gruss, A, Tailliez, P and Delacroix-Buchet, A (2002) Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **68** 3691-3701.
- Oppegard, C, Rogne, P, Emanuelsen, L, Kristiansen, P E, Fimland, G and Nissen-Meyer, J (2007) The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *J Mol Microbiol Biotechnol* **13** 210-219.
- Orrhage, K, Sjostedt, S and Nord, C E (2000) Effect of supplements with lactic acid bacteria and oligofructose on the intestinal microflora during administration of cefpodoxime proxetil. *J Antimicrob Chemother* **46** 603-612.
- Ouwehand, A C and Salminen, S J (1998). The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria *Int Dairy J* **8** 749-758.
- Ouwehand, A, Kirjavainen, P, Shortt, C and Salminen, S (1999) Probiotics: mechanisms and established effects *Int. Dairy J* **9** 43-52.
- Ouwehand, a C, Tolkkio, S, Kulmala, J, Salminen, S and Salminen, E (2000) Adhesion of inactivated probiotic strains to intestinal mucus. *Lett Appl Microbiol* **31** 82-86.
- Owens, R C, Jr. (2008) Antimicrobial stewardship: concepts and strategies in the 21st century. *Diagn Microbiol Infect Dis* **61** 110-128.
- Pan, Y and Breidt, F, Jr. (2007) Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. *Appl Environ Microbiol* **73** 8028-8031.

- Parche, S, Beleut, M, Rezzonico, E, *et al.* (2006) Lactose-over-glucose preference in *Bifidobacterium longum* NCC2705: glcP, encoding a glucose transporter, is subject to lactose repression. *J Bacteriol* **188** 1260-1265.
- Parra, M D, Martinez De Morentin, B E, Cobo, J M, Mateos, A and Martinez, J A (2004) Daily ingestion of fermented milk containing *Lactobacillus casei* DN114001 improves innate-defense capacity in healthy middle-aged people. *J Physiol Biochem* **60** 85-91.
- Pham, M, Lemberg, D A and Day, a S (2008) Probiotics: sorting the evidence from the myths. *Med J Aust* **188** 304-308.
- Pokusaeva, K, O'connell-Motherway, M, Zomer, A, Fitzgerald, G F and Van Sinderen, D (2009) Characterization of two novel alpha-glucosidases from *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Appl Environ Microbiol* **75** 1135-1143.
- Pool-Zobel, B L (2005) Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. *Br J Nutr* **93 Suppl 1** S73-90.
- Prado, F C, Parada, J L, Pandey, A and Soccol, C (2008) Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Res. Int* **41** 111-123.
- Prantera, C, Scribano, M L, Falasco, G, Andreoli, A and Luzi, C (2002) Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with Lactobacillus GG. *Gut* **51** 405-409.
- Raes, J, Korb, J O, Lercher, M J, Von Mering, C and Bork, P (2007) Prediction of effective genome size in metagenomic samples. *Genome Biol* **8** R10.
- Rafter, J (2003) Probiotics and colon cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **17** 849-859.
- Rafter, J, Bennett, M, Caderni, G, *et al.* (2007) Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am J Clin Nutr* **85** 488-496.
- Rajilic-Stojanovic, M, Heilig, H G, Molenaar, D, *et al.* (2009) Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environ Microbiol*.
- Requena, T, Burton, J, Matsuki, T, *et al.* (2002) Identification, detection, and enumeration of human *bifidobacterium* species by PCR targeting the transaldolase gene. *Appl Environ Microbiol* **68** 2420-2427.
- Requena, T y Peláez, C (1995) Revisión: Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. *Rev Esp de Cienc y Tecnol de Aliment* **3** 19-44.

- Rinne, M, Kalliomaki, M, Arvilommi, H, Salminen, S and Isolauri, E (2005) Effect of probiotics and breastfeeding on the *bifidobacterium* and *lactobacillus/enterococcus* microbiota and humoral immune responses. *J Pediatr* **147** 186-191.
- Robinson, R K and Tamime (1990) Microbiology of fermented milks. Dairy Microbiology (ed. R K Robinson), Elsevier Science Publishers, London. Vol 2, 2nd edn, pp 291-343.
- Robinson, R K and Tamime, A Y (2006) Types of fermented milks. En: *Fermented milks* (ed. A Y Tamime), Blackwell Publishing Science, UK, pp.1-4.
- Rodas, a M, Ferrer, S and Pardo, I (2005) Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *Int J Syst Evol Microbiol* **55** 197-207.
- Rodríguez, E, Arques, J L, Rodriguez, R, Nunez, M and Medina, M (2003) Reuterin production by lactobacilli isolated from pig faeces and evaluation of probiotic traits. *Lett Appl Microbiol* **37** 259-263.
- Rohde, C L, Bartolini, V and Jones, N (2009) The use of probiotics in the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea with special interest in *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Nutr Clin Pract* **24** 33-40.
- Rohde, B H and Quadri, L E (2006) Functional characterization of a three-component regulatory system involved in quorum sensing-based regulation of peptide antibiotic production in *Carnobacterium maltaromaticum*. *BMC Microbiol* **6** 93.
- Rojo-Bezares, B, Saenz, Y, Navarro, L, Zarazaga, M, Ruiz-Larrea, F and Torres, C (2007) Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must. *Food Microbiol* **24** 482-491.
- Roy, D (2001) Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products *Int J Food Microbiol* **69** 167-182.
- Roy, D, Ward, P, Vincent, D and Mondou, F (2000) Molecular identification of potentially probiotic lactobacilli. *Curr Microbiol* **40** 40-46.
- Ruszczynski, M, Radzikowski, A and Szajewska, H (2008) Clinical trial: effectiveness of *Lactobacillus rhamnosus* (strains E/N, Oxy and Pen) in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children. *Aliment Pharmacol Ther* **28** 154-161.
- Saarela, M, Lahteenmaki, L, Crittenden, R, Salminen, S and Mattila-Sandholm, T (2002) Gut bacteria and health foods--the European perspective. *Int J Food Microbiol* **78** 99-117.
- Saarela, M, Mogensen, G, Fonden, R, Matto, J and Mattila-Sandholm, T (2000) Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol* **84** 197-215.

- Sachdeva, A and Nagpal, J (2009) Effect of fermented milk-based probiotic preparations on *Helicobacter pylori* eradication: a systematic review and meta-analysis of randomized-controlled trials. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **21** 45-53.
- Safdar, N, Barigala, R, Said, A and Mckinley, L (2008) Feasibility and tolerability of probiotics for prevention of antibiotic-associated diarrhoea in hospitalized US military veterans. *J Clin Pharm Ther* **33** 663-668.
- Saito, M, Matsumoto, M and Funabashi, M (1992) Detection of *Clostridium perfringens* enterotoxin gene by the polymerase chain reaction amplification procedure. *Int J Food Microbiol* **17** 47-55.
- Satokari, R M, Vaughan, E E, Smidt, H, Saarela, M, Matto, J and De Vos, W M (2003) Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract. *Syst Appl Microbiol* **26** 572-584.
- Schell, M A, Karmirantzou, M, Snel, B, *et al.* (2002) The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** 14422-14427.
- Schrezenmeir, J and De Vrese, M (2001) Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition. *Am J Clin Nutr* **73** 361S-364S.
- Servin, a L (2004) Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* **28** 405-440.
- Shortt, C (1999) The probiotic century: historical and current perspectives *Trends Food Sci Technol* **10** 411-417.
- Shu, Q, Qu, F and Gill, H S (2001) Probiotic treatment using *Bifidobacterium lactis* HN019 reduces weanling diarrhea associated with rotavirus and *Escherichia coli* infection in a piglet model. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **33** 171-177.
- Sinhg, S, Goswami, P, Singh, R and Heller, K (2009) Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. *Food Sci Technol* **42** 448-457.
- Stecher, B and Hardt, W D (2008) The role of microbiota in infectious disease. *Trends Microbiol* **16** 107-114.
- Su, P, Henriksson, A and Mitchell, H (2007) Prebiotics enhance survival and prolong the retention period of specific probiotic inocula in an in vivo murine model. *J Appl Microbiol* **103** 2392-2400.
- Szymanski, H, Armanska, M, Kowalska-Duplaga, K and Szajewska, H (2008) *Bifidobacterium longum* PL03, *Lactobacillus rhamnosus* KL53A, and *Lactobacillus plantarum* PL02 in

- the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: a randomized controlled pilot trial. *Digestion* **78** 13-17.
- Szilagyi, A (2002) Review article: lactose--a potential prebiotic. *Aliment Pharmacol Ther* **16** 1591-1602.
- Szymanski, H, Armanska, M, Kowalska-Duplaga, K and Szajewska, H (2008) *Bifidobacterium longum* PL03, *Lactobacillus rhamnosus* KL53A, and *Lactobacillus plantarum* PL02 in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: a randomized controlled pilot trial. *Digestion* **78** 13-17.
- Tabasco, R, Paarup, T, Janer, C, Peláez, C and Requena, T (2007) Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. *Int Dairy J* **17** 1107-1114.
- Tannock, G W, Tilsala-Timisjarvi, A, Rodtong, S, Ng, J, Munro, K and Alatossava, T (1999) Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Appl Environ Microbiol* **65** 4264-4267.
- Temmerman, R, Scheirlinck, I, Huys, G and Swings, J (2003) Culture-independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **69** 220-226.
- Thomas, M R, Litin, S C, Osmon, D R, Corr, a P, Weaver, a L and Lohse, C M (2001) Lack of effect of *Lactobacillus* GG on antibiotic-associated diarrhea: a randomized, placebo-controlled trial. *Mayo Clin Proc* **76** 883-889.
- Turovskiy, Y, Kashtanov, D, Paskhover, B and Chikindas, M L (2007) Quorum sensing: fact, fiction, and everything in between. *Adv Appl Microbiol* **62** 191-234.
- Tursi, A, Brandimarte, G, Giorgetti, G M, Forti, G, Modeo, M E and Gigliobianco, A (2004) Low-dose balsalazide plus a high-potency probiotic preparation is more effective than balsalazide alone or mesalazine in the treatment of acute mild-to-moderate ulcerative colitis. *Med Sci Monit* **10** PI126-131.
- Van De Guchte, M, Penaud, S, Grimaldi, C, *et al.* (2006) The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** 9274-9279.
- Van Loo, J (2004) The specificity of the interaction with intestinal bacterial fermentation by prebiotics determines their physiological efficacy. *Nutr Res Rev* **17** 89-98.

- Vanhoutte, T, De Preter, V, De Brandt, E, Verbeke, K, Swings, J and Huys, G (2006) Molecular monitoring of the fecal microbiota of healthy human subjects during administration of lactulose and *Saccharomyces boulardii*. *Appl Environ Microbiol* **72** 5990-5997.
- Vankerckhoven, V, Huys, G, Vancanneyt, M, *et al.* (2008) Genotypic diversity, antimicrobial resistance, and virulence factors of human isolates and probiotic cultures constituting two intraspecific groups of *Enterococcus faecium* isolates. *Appl Environ Microbiol* **74** 4247-4255.
- Vaughan, E E, Schut, F, Heilig, H G, Zoetendal, E G, De Vos, W M and Akkermans, a D (2000) A molecular view of the intestinal ecosystem. *Curr Issues Intest Microbiol* **1** 1-12.
- Ventura, M, Elli, M, Reniero, R and Zink, R (2001) Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol Ecol* **36** 113-121.
- Vesper, S, Mckinstry, C, Hartmann, C, Neace, M, Yoder, S and Vesper, A (2008) Quantifying fungal viability in air and water samples using quantitative PCR after treatment with propidium monoazide (PMA). *J Microbiol Methods* **72** 180-184.
- Wagner, M, Smidt, H, Loy, A and Zhou, J (2007) Unravelling microbial communities with DNA-microarrays: challenges and future directions. *Microb Ecol* **53** 498-506.
- Wang, M, Ahrne, S, Antonsson, M and Molin, G (2004) T-RFLP combined with principal component analysis and 16S rRNA gene sequencing: an effective strategy for comparison of fecal microbiota in infants of different ages. *J Microbiol Methods* **59** 53-69.
- Ward, L J and Timmins, M J (1999) Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol* **29** 90-92.
- Wenus, C, Goll, R, Loken, E B, Biong, a S, Halvorsen, D S and Florholmen, J (2008) Prevention of antibiotic-associated diarrhoea by a fermented probiotic milk drink. *Eur J Clin Nutr* **62** 299-301.
- Williams, J G, Kubelik, a R, Livak, K J, Rafalski, J A and Tingey, S V (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* **18** 6531-6535.
- Wollowski, I, Rechkemmer, G and Pool-Zobel, B L (2001) Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am J Clin Nutr* **73** 451S-455S.

- Woodmansey, E J (2007) Intestinal bacteria and ageing. *J Appl Microbiol* **102** 1178-1186.
- Wu, R, Wang, L, Wang, J, Li, H, Menghe, B, Wu, J, Guo, M, Zhang, H (2009) Isolation and preliminary probiotic selection of lactobacilli from koumiss in Inner Mongolia. *J Basic Microbiol* **49** 318-326.
- Xu, J, Mahowald, M A, Ley, R E, Lozupone, C A, Hamady, M, *et al* (2007) Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine. *PLoS Biol* **5**:e 156.
- Zboril, V (2002) Physiology of microflora in the digestive tract. *Vnitr Lek* **48** 17-21.
- Zoetendal, E G, Ben-Amor, K, Harmsen, H J, Schut, F, Akkermans, a D and De Vos, W M (2002a) Quantification of uncultured *Ruminococcus obeum*-like bacteria in human fecal samples by fluorescent in situ hybridization and flow cytometry using 16S rRNA-targeted probes. *Appl Environ Microbiol* **68** 4225-4232.
- Zoetendal, E G, Collier, C T, Koike, S, Mackie, R I and Gaskins, H R (2004) Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr* **134** 465-472.
- Zoetendal, E G, Rajilic-Stojanovic, M and De Vos, W M (2008) High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut* **57** 1605-1615.
- Zoetendal, E G, Vaughan, E E and De Vos, W M (2006) A microbial world within us. *Mol Microbiol* **59** 1639-1650.
- Zoetendal, E G, Von Wright, A, Vilpponen-Salmela, T, Ben-Amor, K, Akkermans, a D and De Vos, W M (2002b) Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl Environ Microbiol* **68** 3401-3407.

